

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e
agreste do estado da Paraíba**

TEREZA EMMANUELLE DE FARIAS ROTONDANO
Orientadora: Prof^a. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e agreste do estado da Paraíba

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas. Sob a orientação da Professora Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano

Orientadora: Prof^a. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Rotondano, Tereza Emmanuelle de Farias

Doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e agreste do Estado da Paraíba/ Recife: O Autor, 2014.

folhas : il., fig., tab.

Orientador: Alzira Maria Paiva de Almeida

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014.**

Inclui bibliografia e anexos

**1. Zoonoses 2. Cão 3. Carrapato I. Almeida, Alzira Maria Paiva de
(orientador) II. Título**

571.98

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 290

TEREZA EMMANUELLE DE FARIAS ROTONDANO

Doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e agreste do estado da Paraíba

APROVADO EM: 27 de fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida -- Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Marise Sobreira – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Virginia Maria Barros de Lorena – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Milena de Paiva Cavalcanti – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira – Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

“Abro as portas do meu ser a tudo o que é bom e as fecho cuidadosamente diante do que é ruim. Essa força tão bela e persistente me permite enfrentar qualquer obstáculo. Nunca me sinto desanimada, pensando que me faltam coisas boas. A dúvida e a insegurança são apenas o pânico gerado por uma mente fraca. Com um coração firme e uma mente aberta, tudo se torna possível” - Helen Keller.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e guardado em todos os momentos de minha vida;

Aos meus pais Éder e Ana Cleide e minha irmã Anna Rafaella, aos quais devo tudo o que sou vocês me inspiram a viver;

A minha família como um todo, a qual sempre me ofereceu apoio e orientação;

Ao meu namorado Ramon, pela compreensão e carinho;

Às professoras Marcia Melo e Alzira Maria pela orientação desse trabalho e contribuição na minha formação acadêmica e pessoal;

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Campina Grande – Werona Oliveira, Expedito Kennedy, Vanessa Lira, Gilzane Dantas, Heitor Cândido– pelo apoio e companheirismo durante a experimentação, dividindo problemas e soluções, sem vocês não seria possível concluir esse trabalho;

Aos meus amigos Ivana Vidal e Artur Pombo pelo auxílio durante as cansativas coletas e organização das amostras;

A minha querida amiga Dijanah Cota, companheira durante o mestrado e doutorado a qual é exemplo de determinação e amizade incondicionais;

À equipe do Laboratório de Parasitologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo nas pessoas do doutorando Felipe Krawczak e do professor Marcelo Labruna, pelo apoio e orientação durante o processamento das amostras sendo de fundamental importância para a conclusão dessa pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (*CNPq*) pelo incentivo financeiro por meio da bolsa de estudo concedida durante o período de doutoramento;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO - ROTONDANO, T.E.F. Doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e agreste do estado da Paraíba. Doenças transmitidas por carrapatos são uma importante causa de morbidade e mortalidade em cães (*Canis lupus familiaris*) de todo o mundo, com o *Rhipicephalus sanguineus* (o carrapato marrom do cão), apontado como vetor de vários patógenos. Pesquisar locais com condições potenciais para o desenvolvimento destas doenças, como presença de carrapatos vetores e seus hospedeiros, e a pesquisa dos agentes responsáveis que circulam numa população são importantes para o controle dos agravos. Nosso trabalho objetivou investigar a ocorrência das principais doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão (clima semiárido) e agreste (clima úmido) do estado da Paraíba. Amostras de sangue foram coletadas juntamente com a aplicação de um questionário epidemiológico visando à obtenção de informações sobre os cães e seus proprietários. As amostras sanguíneas foram analisadas por exame direto, provas hematológicas, sorológicas e moleculares e os resultados foram avaliados por programa estatístico. Inicialmente buscou-se determinar a melhor fração sanguínea para extração de DNA visando o diagnóstico de erliquiose e anaplasose caninas por nPCR. O sangue total demonstrou ser a melhor fonte de DNA em comparação às frações de papa leucocitária, granulócitos, mononucleares e coágulo sanguíneo, provavelmente por albergar bactérias intracelularmente como também livres no plasma, oriundas de lise celular. Além disso, foi possível identificar, pela primeira vez no estado da Paraíba, a infecção canina por *Anaplasma platys*. *Ehrlichia canis*, também reconhecida pela primeira vez na região, apresenta-se como principal agente transmitido por carrapatos aos cães, no estado da Paraíba. Verificou-se como fatores de risco para erliquiose o ato de não vacinar os cães, o animal ser fêmea, o regime de criação semi-domiciliar e solto, e os proprietários serem analfabetos ou terem cursado apenas o primeiro grau. Anemia, leucopenia e trombocitopenia também apresentaram associação significativa com a ocorrência da erliquiose. Detectou-se pela primeira vez na área estudada *Babesia canis vogeli* e uma correlação significativa foi observada entre a diminuição de plaquetas e a babesiose. *Hepatozoon spp.* não foi observado no estudo. Anticorpos para *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephalii*, *R. amblyommii* e *R. felis* foram detectados em cães dos municípios estudados, sendo essa a primeira evidência (sorológica) de *Rickettsia spp.* no estado da Paraíba. O encontro de infecções por *B. canis vogeli*, *A. platys* e *Rickettsia spp.* indica que esses agentes devem ser incluídos no diagnóstico diferencial na rotina médica veterinária.

Palavras-chave: Cães, Carrapato, Diagnóstico, *Rickettsia spp.*, Erliquiose, Babesiose.

ABSTRACT - ROTONDANO, T.E.F. Tick-borne diseases in dogs in the “sertão” and “agreste” regions of the state of Paraíba. Tick-borne diseases are a major cause of morbidity and mortality in dogs (*Canis lupus familiaris*) worldwide, with *Rhipicephalus sanguineus* (the brown dog tick), incriminated as a vector of several pathogens. Study of local conditions with potential for development of these diseases, presence of tick-vectors and their hosts, and research of pathogens circulating in a population are important for health problems control. Our study aimed to investigate the occurrence of major dog’s tick-transmitted diseases in the “sertão” (semiarid climate) and “agreste” (wet climate) in the State of Paraíba. Blood samples were collected along with the application of an epidemiological questionnaire aimed at obtaining information on the dogs and their owners. The blood samples were analyzed by direct examination, hematological, serological and molecular tests and the results were evaluated by statistical program. Initially we determined the best blood fraction as DNA source for canine ehrlichiosis and anaplasmosis diagnosis by nPCR. Whole blood revealed the best DNA source compared to the leukocyte, granulocytes, and mononuclear blood clots, probably for containing intracellular, as well as, free bacteria in plasma, delivered by cell lysis. Furthermore, it was possible to identify, for the first time in the state of Paraíba, canine *Anaplasma platys* infection. Moreover, *Ehrlichia canis* was recognized for the first time in the region, and presented as the main tick transmitted agent to dogs, in the state of Paraíba. It was found as risk factors for ehrlichiosis: not vaccinate dogs, females, semi – household and street dogs, and poorly educated owners. Anemia, leukopenia, and thrombocytopenia were significantly associated with ehrlichiosis occurrence. *Babesia canis vogeli* was detected for the first time in the area studied and a significant correlation was observed between platelets decreasing and babesiosis. *Hepatozoon* spp. had not been observed in the study. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephalii*, *R. amblyommii* and *R. felis* were detected in dogs in the area studied providing the first evidence (serological) of *Rickettsia* spp. in the state of Paraíba. Unveiling *B. vogeli canis*, *A. platys* and *Rickettsia* spp. infection in the region studied indicates that these agents should be included in the differential diagnosis in veterinary medical routine.

Keywords: Dogs, Tick, Diagnosis, *Rickettsia* spp., Ehrlichiosis, Babesiosis.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Mórula de *Ehrlichia canis*, cepa São Paulo, em cultivo celular de histiócito canino.

Figura 2. Ciclo de vida do *Hepatozoon canis*

Figura 3. RIFI para detecção de anticorpos caninos contra *Rickettsia rickettsii*.

Figura 4. Fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* em oviposição (A) e realizando repasto sanguíneo em um cão (B).

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis

Figure 1. Detection of *Ehrlichia canis* in nPCR with EHCA sense and antisense primers for rRNA 16S gene. Lane 1: 100 base pair (bp) DNA ladder; lanes from 2 to 5: nPCR with DNA from WB; lane 6: *E. canis*-positive control and DNA from WB; lane 7: negative control; lane 8: nPCR-negative control.

Estudo de prevalência e fatores de risco de Erliquiose Monocítica Canina e outras rickettsioses em cães, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Fig. 1. Localização geográfica dos municípios do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, onde foram coletadas as amostras de sangue dos cães do estudo.

LISTA DE TABELAS E QUADROS DOS ARTIGOS

An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis

Table 1. The primer sequences for the 16S rRNA gene used to detect the *E. canis* and *A. platys* by the nPCR reactions.

Table 2. Hematological, blood smear direct examination and whole blood (WB), granulocytes (G), peripheral blood mononuclear cells (M), buffy coat (BC) and blood clot (C) PCR results of dogs with clinical signs of ehrlichiosis.

Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Paraíba State, Northeastern Brazil

Table 1. Selected variables in univariate analysis associated with the *Babesia* spp.-specific PCR results for the dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil.

Table 2. Selected variables in univariate analysis associated with the *Ehrlichia canis*-specific IFA and PCR results for the dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil.

Estudo de prevalência e fatores de risco de Erliquiose Monocítica Canina e outras rickettsioses em cães, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Quadro 1. Distribuição, por município, das amostras sorológicas de cães analisadas para detecção de *Rickettsia* spp. por imunofluorescência indireta (RIFI) e *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) no Estado da Paraíba, Brasil

Quadro 2. Análise Univariada dos fatores de risco associados à positividade para *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) em cães no Estado da Paraíba

LISTA DE TABELAS E QUADROS DOS ARTIGOS

Quadro 3. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para 5 espécies de *Rickettsia* em cães do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

Quadro 4. Análise de regressão logística múltipla dos fatores de risco associados à positividade para *Rickettsia* spp. em cães no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

LISTA DE ABREVIACÕES

bp Par de base, do inglês: *base pair*

BC papa leucocitária, do inglês: *buffy coat*

BLAST do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*

C coágulo sanguíneo, do inglês: *blood clot*

CID Coagulação intravascular disseminada

CME Erliquiose Monocítica Canina, do inglês: *Canine Monocytic Ehrlichiosis*

DCTV Doenças caninas transmitidas por vetores

DNA Ácido Desoxirribonucleico, do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*

dNTP Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

ELISA Ensaio Imunoenzimático, do inglês: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EMC Erliquiose Monocítica Canina

FMB Febre Maculosa Brasileira

FMMR Febre Maculosa das Montanhas Rochosas

G granulócitos do inglês: *granulocytes*

GFM Grupo da Febre Maculosa

HCl Ácido Clorídrico

IFAT Reação de Imunofluorescência Indireta, do inglês: *Indirect immunofluorescence antibody test*

KCl Cloreto de Potássio

M células mononucleares

MgCl₂ Cloreto de Magnésio

μL Microlitro

μmol/L Micromoles por litro

ml Mililitro

mM Milimolar

nPCR do inglês: *nested PCR*

LISTA DE ABREVIACOES

OMS Organização Mundial de Saúde

PAERH Possível antígeno envolvido na reação homóloga

PCR Reação em Cadeia pela Polimerase do inglês: *Polymerase Chain Reaction*

qPCR do inglês: *quantitative PCR*

RFLP-PCR do inglês: *restriction fragment length polymorphism - PCR*

RIFI Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA cido Ribonucléico, do inglês: *Ribonucleic Acid*

rRNA RNA ribossomal, do inglês: *Ribosomal ribonucleic acid*

snPCR do inglês: *semi nested PCR*

TBE Tris Borato EDTA

TCC Trombocitopenia cíclica canina

WB do inglês: *Western blott*

WB Sangue total, do inglês: *Whole blood*

SUMÁRIO

Pág.

1. Introdução.....	16
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. Revisão Bibliográfica.....	20
4.1. Erliquiose e Anaplasmoses Caninas.....	20
4.1.1. Agente Etiológico e Classificação.....	20
4.1.2. Epidemiologia.....	20
4.1.3. Sinais Clínicos.....	22
4.1.4. Diagnóstico.....	22
4.1.4.1. Hematologia.....	23
4.1.4.2. Citologia.....	23
4.1.4.3. Sorologia.....	24
4.1.4.4. Detecção Molecular.....	26
4.1.4.5. Cultivo Celular.....	27
4.1.5. Tratamento.....	28
4.2. Babesiose Canina.....	29
4.2.1. Agente Etiológico e Classificação.....	29
4.2.2. Epidemiologia.....	29
4.2.3. Sinais Clínicos.....	30
4.2.4. Diagnóstico.....	31
4.2.4.1. Citologia.....	31
4.2.4.2. Sorologia.....	31
4.2.4.3. Detecção Molecular.....	32
4.2.5. Tratamento.....	32
4.3. Hepatozoonose Canina.....	33
4.3.1. Agente Etiológico e Classificação.....	33
4.3.2. Epidemiologia.....	33
4.3.3. Sinais Clínicos.....	35
4.3.4. Diagnóstico.....	36
4.3.4.1. Citologia.....	36

4.3.4.2. Sorologia.....	37
4.3.4.3. Detecção Molecular.....	37
4.3.5. Tratamento.....	38
4.4. Febre Maculosa.....	39
4.4.1. Agente Etológico e Classificação.....	39
4.4.2. Epidemiologia.....	39
4.4.3. Diagnóstico.....	41
4.4.3.1. Cultivo Celular.....	42
4.4.3.2. Sorologia.....	42
4.4.3.3. Detecção Molecular.....	43
4.4.4. Tratamento.....	44
4.5. Principais Vetores Envolvidos na Transmissão de Hemoparasitoses.....	44
4.6. Controle e Prevenção das Doenças Transmitidas por Carrapatos.....	46
4.6.1. Controle de Vetores.....	46
4.6.1.1. Estratégias Químicas.....	46
4.6.1.2. Estratégias Não-Químicas.....	47
4.6.2. Vacinas.....	48
5. Metodologia e Resultados.....	49
Artigo 1.....	50
Artigo 2.....	57
Artigo 3.....	76
6. Discussão Geral.....	98
7. Conclusões e Perspectivas.....	101
8. Referências Bibliográficas.....	102
9. Anexos.....	124

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores aos cães representam um grupo variado e complexo de patologias, incluindo a anaplasmose, babesiose, bartonelose, borreliose, dirofilariose, erliquiose, leishmaniose e rickettsioses, com novas síndromes sendo descobertas a cada ano. Muitas dessas doenças podem causar graves condições clínicas, com risco de vida, em cães, com um número considerável tendo potencial zoonótico, afetando, dessa forma, a população humana. Hoje essas doenças representam uma ameaça global crescente à medida que continuam a sua propagação longe de sua tradicional ocorrência geográfica e restrições temporais.

A erliquiose monocítica canina (EMC) causada pela *Ehrlichia canis* é uma doença multissistêmica a qual se manifesta nas formas aguda, subclínica ou crônica. Estas manifestações podem ser afetadas pela virulência de diferentes cepas e co-infecções com outros patógenos também transmitidos por carrapatos, como *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis*. A trombocitopenia cíclica canina ocorre quando, principalmente, as plaquetas são infectadas por *Anaplasma platys* (anteriormente classificada como *E. platys*). O tropismo dessa espécie por trombócitos é único entre os agentes erliquiais, mesmo apesar de todos esses causarem trombocitopenia.

A babesiose canina causa febre, anorexia, esplenomegalia, anemia e trombocitopenia grave. *B. canis vogeli* é o agente etiológico mais difundido entre os cães, devido à natureza cosmopolita de seu hospedeiro, o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*. Os protozoários do gênero *Hepatozoon* podem infectar os cães quando esses ingerem carrapatos, ou partes deles, infectados com o patógeno. Essa infecção é geralmente mal diagnosticada pelos veterinários haja vista que os sinais clínicos apresentados pelo animal são semelhantes aos de outras doenças transmitidas por carrapatos, tais como erliquiose e babesiose.

As rickettsioses são doenças causadas por bactérias da família Rickettsiaceae na qual está classificado o gênero *Rickettsia*, ocorrem mundialmente sendo transmitidas por uma variedade de espécies de carrapatos, cada uma com exigências específicas. Dessa forma, a epidemiologia das várias rickettsioses é determinada pela distribuição geográfica específica do carrapato vetor. Na condição de hospedeiro para os carrapatos vetores da Febre Maculosa Brasileira (FMB), o cão pode ser utilizado como importante sentinela em estudos de vigilância epidemiológica e a prevalência de reações sorológicas positivas em cães de uma área geográfica põe em evidência o risco de infecção humana.

O estado da Paraíba localiza-se na região Nordeste do Brasil e possui um clima quente, com temperaturas elevadas durante todo o ano. Na região litorânea, o clima é classificado como tropical úmido, com temperaturas médias em torno de 24°C, em direção ao interior o clima

abundante é o semiárido, caracterizado pelas chuvas escassas e irregulares, com baixa pluviosidade. Os estudos acerca da ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos, bem como das ferramentas de diagnóstico dessas doenças nessa área ainda são escassos. Dessa forma, o presente trabalho apresenta, no formato de artigos, três diferentes estudos os quais objetivaram o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e uma melhor compreensão da real situação epidemiológica dessas doenças.

.

2. JUSTIFICATIVA

É sabido que os cães constituem fonte de infecção de diversos patógenos, transmitidos por carrapatos, para os humanos. Em uma era de zoonoses emergentes pesquisar locais que possuem potencial para desenvolver condições para o aparecimento destas doenças é importante para alcançar o diagnóstico precoce, tratamento e controle, fundamentais para a manutenção do bem estar animal e humano. Além disso, embora as doenças estudadas no presente trabalho já tenham sido bastante pesquisadas no Brasil, a região em questão ainda encontra-se carente de trabalhos que reflitam a real situação epidemiológica das mesmas e explorando ferramentas de diagnóstico eficazes.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência e prevalência das principais doenças, de importância médica, transmitidas por carrapatos aos cães nas mesorregiões do sertão e agreste do estado da Paraíba, e no município de Recife, estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o sangue total e suas frações como fonte de DNA para detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* por PCR;

Por meio de inquérito sorológico e molecular conhecer os agentes, transmitidos por carrapatos, responsáveis por doenças na população canina no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil;

Avaliar o grau de concordância de técnicas diretas e indiretas no diagnóstico de erliquiose monocítica canina;

Identificar possíveis fatores de risco associados à ocorrência de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp. em cães no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Erliquiose e Anaplasmoses Caninas

4.1.1. Agente Etiológico e Classificação

Taxonomicamente as erlíquias pertencem à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae e se caracterizam por serem bactérias gram-negativas, pleomórficas e de crescimento intracelular obrigatório (DAGNONE *et al.*, 2009). Os membros da família Anaplasmataceae se replicam em vacúolos, conhecidos como mórula, derivados da membrana celular das células infectadas, que são principalmente monócitos e macrófagos caninos (Figura 1) (DUMLER *et al.*, 2001).

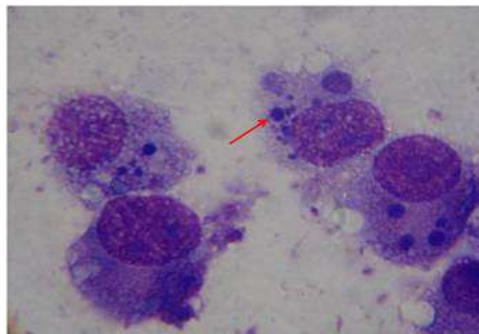


Figura 1- Seta: Mórula de *Ehrlichia canis*, cepa São Paulo, em cultivo celular de histiócito canino (Arquivo pessoal).

De acordo com esta característica, as espécies são classificadas em formas monocíticas (*E. canis*, *E. risticii*), granulocíticas (*E. ewingii* e *E. equi*) e trombocíticas (*Anaplasma platys*), embora essa divisão possua limitações, pois uma espécie pode infectar mais de um tipo celular (COHN, 2003). A classificação mais fidedigna baseia-se na amplificação e sequenciamento do RNA ribossomal (rRNA) 16S com objetivo de agrupar as espécies por homologia de suas sequências (DUMLER *et al.*, 2001).

E. canis infecta monócitos e é o agente causador da erliquiose monocítica canina (EMC) (ALMOSNY, 2002). *A. platys* parasita preferencialmente plaquetas, resultando na doença conhecida como trombocitopenia cíclica canina (TCC), muitas vezes sem sinais clínicos aparentes (HARVEY *et al.*, 1978; TROY *et al.*, 1990).

4.1.2. Epidemiologia

A infecção canina ocorre quando as secreções salivares do carrapato infectado contaminam o ponto de fixação durante a ingestão de um repasto sanguíneo. Todos os três estágios podem transmitir a doença (larva, ninfa e adulto) (ALMOSNY, 2002). A bactéria penetra nas células

mononucleares sob a forma de corpúsculos elementares (SANTARÉM, 2003) que são as formas individuais do parasito. Uma vez inoculados na circulação, entram nos monócitos. Ao contrário das riquetsias, as erlíquias se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira, a fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpúsculos elementares, crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo nas células hospedeiras infectadas por divisão binária. As inclusões intracelulares formadas pelas erlíquias no hospedeiro formam as mórulas e são observadas nos leucócitos na fase aguda da infecção, em pequeno número e por curto período de tempo. Cada mórula contém vários corpos elementares, os quais são liberados com o rompimento da célula e irão infectar outras células iniciando um novo ciclo (McDADE, 1990).

A TCC ocorre quando, principalmente, as plaquetas são infectadas por *A. platys*. O tropismo dessa espécie por trombócitos é único entre os agentes erliquiais, mesmo apesar de todos esses causarem trombocitopenia (COHN, 2003). A doença é assim denominada devido ao fato do número de plaquetas circulantes diminuir a cada 7-14 dias (HARRUS *et al.*, 1997). As trombocitopenias iniciais podem se desenvolver, principalmente, como consequência da lesão direta às plaquetas pela replicação dos organismos. No entanto, mecanismos imune mediados de trombocitopenia tornam-se mais importante em episódios subsequentes de trombocitopenia (HARVEY *et al.*, 1978). A fração de plaquetas infectadas diminui drasticamente em parasitemias sucessivas, mas os episódios de trombocitopenia associados continuam a ser graves (FRENCH e HARVEY, 1993).

Infecções por *A. platys* e *E. canis* são freqüentemente encontradas nas mesmas regiões geográficas e indícios de exposição ou infecção por ambos os organismos são comumente detectados no mesmo cão (HARRUS *et al.*, 1997; CARDOSO *et al.*, 2008; GAL *et al.*, 2008; DINIZ *et al.*, 2010). Ambos os organismos são encontrados em todos os continentes, porém são mais prevalentes em climas tropical e subtropical (STICH *et al.*, 2008; IABSLEY *et al.*, 2008).

A erliquiose canina está presente em virtualmente todas as regiões do Brasil (TRAPP *et al.*, 2006; DAGNONE *et al.*, 2003; MACIEIRA *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2007; LABRUNA *et al.*, 2007a; LABARTHE *et al.*, 2003; PAIVA *et al.*, 2007). Estudos no nosso país têm revelado prevalências de EMC que variam de 4,8% a 65% em cães oriundos de zona rural ou urbana (AGUIAR *et al.*, 2007; COSTA JR *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2008). Entre cães atendidos em clínica e hospitais veterinários, a frequência de animais infectados tem oscilado entre 20 a 57% (BULLA *et al.*, 2004; DAGNONE *et al.*, 2003; TRAPP *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2009). A prevalência da infecção pode ser tão elevada como 46,7% em cães assintomáticos (SANTOS *et al.*, 2009) quanto 78% em cães sintomáticos (PAIVA *et al.*, 2007).

De acordo com Soares *et al.* (2006) o risco de infecção por *E. canis* parece ser mais elevado para os cães que vivem em casas quando comparado com os cães que vivem em apartamentos. Isso é esperado, porque os cães que vivem em casas com quintais são teoricamente mais expostos a carrapatos do que aqueles que vivem em apartamentos. Estudos soroepidemiológico revelaram que cães adultos do sexo masculino são mais propensos a apresentar anticorpos para *E. canis*, particularmente aqueles infestados por carrapatos (TRAPP *et al.*, 2006; COSTA-JR *et al.*, 2007). Apesar de *E. canis* ser considerada a principal espécie causadora de erliquiose no Brasil, *A. platys* tem sido identificada por PCR em algumas regiões com prevalências variando entre 15,84% e 55% (FERREIRA *et al.*, 2007; DAGNONE *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009).

4.1.3. Sinais Clínicos

A EMC é uma doença multissistêmica a qual se manifesta nas formas aguda, subclínica ou crônica. Estas manifestações podem ser afetadas pela virulência de diferentes cepas de *E. canis* e co-infecções com outros patógenos também transmitidos por carrapatos, como *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis* (GAL *et al.*, 2008). A co-infecção com mais de uma espécie erliquial ou com outros hemoparasitas é comum (RAMOS *et al.*, 2009; DAGNONE *et al.*, 2009), o impacto clínico de uma co-infecção por *E. canis* e *A. platys* na fisiopatologia da doença em cães ainda não está completamente elucidado (BEALL *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos mais comuns associados com erliquiose, anaplasmosose e também babesiose, são febre e letargia. Outros sintomas inespecíficos incluem anorexia, diarreia e vômito, linfadenopatia, desconforto respiratório e, ocasionalmente, sinais neurológicos (CARDOSO *et al.*, 2010; FOGLIA *et al.*, 2006; VAN DE MAELE *et al.*, 2008). Em casos de co-infecção com dois ou mais agentes é muito difícil atribuir os sinais clínicos e anormalidades hematológicas e bioquímicas a um único agente (IZZU *et al.*, 2013). Geralmente infecções crônicas não são reconhecidas, pois os cães infectados parecem saudáveis até o surgimento de distúrbios hemorrágicos, pancitopenia, uveíte e perda de peso ou até o diagnóstico ser realizado (GREENE, 2006).

4.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico das doenças caninas transmitidas por vetores (DCTV) representa um desafio substancial para os veterinários visto que os sinais clínicos induzidos pelos vários agentes patogênicos podem ser semelhantes além de co-infecções com dois ou mais agentes as quais podem levar a sinais clínicos atípicos ou à sobreposição dos mesmos. O diagnóstico confirmatório dessas doenças deve incluir o histórico de exposição aos artrópodes vetores, sinais clínicos compatíveis,

confirmação laboratorial, apoiada por testes citológicos, sorológicos e moleculares. Durante a última década, as técnicas moleculares (por exemplo os métodos baseados em PCR) têm provado ser útil para a confirmação diagnóstica de muitas DCTVs, enquanto a sorologia ou citologia tem sido historicamente utilizada em inquéritos epidemiológicos ou para confirmação de um diagnóstico clínico, respectivamente (OTRANTO *et al.*, 2009).

4.1.4.1 Hematologia

A contagem de células sanguíneas é um constituinte essencial no diagnóstico da EMC e TCC. Na fase aguda, trombocitopenia moderada a severa é um achado hematológico distinto. A avaliação, no esfregaço sanguíneo, do número de plaquetas é essencial para confirmar a presença real da trombocitopenia, a qual, na fase aguda, é geralmente acompanhada de leve anemia e discreta redução das células brancas (HARRUS e WANER, 2011).

Gaunt *et al.*, (2010) sugeriram que a diminuição de plaquetas ocorreria de forma mais rápida em cães infectados apenas por *A. platys* quando comparados aqueles com infecção unicamente por *E. canis* indicando, possivelmente, diferentes mecanismo fisiopatológicos para a trombocitopenia. Em comparação com *E. canis*, a qual induz trombocitopenia em associação com o desenvolvimento de anticorpos anti-plaquetários, *A. platys* infecta diretamente as plaquetas e pode ter um efeito mais imediato sobre a meia-vida dessas células na circulação (FRENCH *et al.*, 1993; HARRUS *et al.*, 1997; WANER *et al.*, 1995).

A anemia presente em cães infectados com *Ehrlichia* ou *Anaplasma* é geralmente leve, normocítica, normocrômica e não regenerativa (MAGNARELLI *et al.*, 1990; GAUNT *et al.*, 2010). Enquanto que na infecção simultânea pelos dois agentes tanto a anemia como a trombocitopenia tendem a ser mais pronunciadas (GAUNT *et al.*, 2010).

Bulla *et al.* (2004) e Dagnone *et al.* (2003) indicam que a erliquiose seja incluída como diagnóstico diferencial em cães anêmicos e trombocitopênicos, por outro lado Santos *et al.* (2009) observaram uma elevada prevalência de *E. canis* em cães não trombocitopênicos e recomendaram a associação da avaliação hematológica com testes de diagnóstico complementares evitando dessa forma a utilização desnecessária de antibióticos.

4.1.4.2 Citologia

O diagnóstico com base em esfregaço sanguíneo tem baixa sensibilidade, uma vez que existem poucas bactérias presentes nas amostras, as mórulas podem ser visualizadas apenas durante a fase aguda e a porcentagem de células infectadas é normalmente inferior a 1% (CADMAN *et al.*,

1994). A baixa sensibilidade dessa técnica vem sendo relatada por diversos autores (RAMOS, 2009; NAKAGHI, 2008; MASSUNG *et al.*, 1998).

A citologia também apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico de infecções por *A. platys*, devido à presença cíclica do agente associada ou não ao baixo número de plaquetas (DAGNONE *et al.*, 2009). Além disso, corpúsculos de inclusão em células sanguíneas muitas vezes estão relacionados à ativação celular em processos inflamatórios, podendo ser confundidos com inclusões de *E. canis* e *A. platys* (FERREIRA *et al.* 2007; MYLONAKIS *et al.* 2003).

Plaquetas, grânulos linfocíticos azurofílicos e material nuclear fagocitado podem ser confundidos com inclusões erliquiais. Entretanto, outros organismos pertencentes à família Anaplasmatacea (*E. chaffeensis*, *N. risticii* e *E. ruminantium*) também podem infectar monócitos caninos (BREITSCHWERTET *et al.*, 1998). Alguns artefatos associados à inexperiência técnica podem também induzir a resultados falso-positivos.

De acordo com Harrus e Waner (2011) essa técnica pode ser otimizada pelo exame de esfregaços de papa leucocitária, o que aumentaria significativamente as chances de se detectar mórulas compatíveis com *E. canis*. Sensibilidade de 66% foi obtida por Mylonakis *et al.* (2003) após avaliação de 1000 campos em esfregaço de papa leucocitária comparada a 34 % apenas quando essa análise foi realizada utilizando-se punção de medula óssea. O tempo necessário para realização desses testes foi de 50 a 60 minutos.

Dados epidemiológicos de prevalência de patógenos erliquiais e seus vetores para determinada região geográfica é que poderão indicar quais diagnósticos diferenciais podem ser relevantes e dentre eles quais deverão ser considerados para a área em particular (HARRUS e WANER, 2011).

4.1.4.3 Sorologia

Vários métodos sorológicos foram desenvolvidos para o diagnóstico da EMC e são considerados valiosas ferramentas de triagem e / ou diagnóstico. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos IgG anti-*E. canis* é considerada "padrão ouro" indicando exposição prévia ao agente. As imunoglobulinas IgM não são consideradas um indicador confiável de exposição a *E. canis* devido ao seu desenvolvimento inconsistente no curso da doença (MCBRIDE *et al.*, 2003), em contraste com o que ocorre com os títulos de IgG ≥ 40 os quais são considerados positivos. Para as infecções agudas, dois testes de RIFI consecutivos, com intervalo de 7-14 dias, são recomendados, e um aumento de 4 vezes no título de anticorpos é sugestivo de uma infecção ativa. Anticorpos anti-*Ehrlichia* IgG persistem por vários meses a anos após o tratamento e eliminação da rickettsia (BARTSCH e GREENE, 1996).

Anticorpos contra vários outros organismos que apresentam reação cruzada com *E. canis* complicam o diagnóstico sorológico da EMC (WANER *et al.*, 2001). A RIFI não pode discriminar entre anticorpos de *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* (CARDENAS *et al.*, 2007). Como existem reações cruzadas em exames sorológicos dentro do mesmo genogruppo, e potencialmente entre genogruppos, a identificação da espécie pode não ser estabelecida na maioria dos estudos clínicos que utilizem apenas a sorologia (SUKASAWAT *et al.*, 2001). Não existe nenhuma reação sorológica cruzada entre *E. canis* e *A. platys* (FRENCH e HARVEY, 1993).

Além da RIFI, a técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) têm sido desenvolvida e mostrou-se útil no diagnóstico da doença. Existem alguns testes comerciais disponíveis, os quais identificam IgG para *E. canis*, como o Immunocomb® (recombinant major antigenic protein 2 - rMAP2 – Biogal, Israel) e o Snap® 3Dx e 4Dx (IDEXX Laboratories Inc., USA), esse último também utilizado na detecção de anticorpos para *Anaplasma*. Harrus *et al.*, (2002) concluíram que esses kits comerciais foram sensíveis e específicos especialmente em amostras com título $\geq 1:320$ na RIFI e sugeriram que o teste ELISA fosse repetido 1-2 semanas após o primeiro ensaio para ultrapassar este problema de sensibilidade. Outros estudos também atestaram a alta sensibilidade e especificidade dessa técnica em detectar anticorpos para espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* reduzindo a probabilidade de reações cruzadas e resultados falso positivos (GAUNT *et al.*, 2010; CHANDRASHEKAR *et al.*, 2010).

O Western blotting é uma técnica mais específica e pode ajudar a caracterizar o agente infeccioso através das “impressões digitais” do perfil da proteína imunogênica. Essa técnica tem sido utilizada para caracterizar e distinguir entre infecções com diferentes organismos causadores de erliquioses, anaplasmoses ou neoriquetsioses e tem potencial para resolver dilemas envolvendo reações cruzadas. Apresentando sensibilidade comparável à RIFI, possui vantagens na objetividade da leitura, pois não sofre influência da subjetividade do operador, como ocorre na imunofluorescência, porém, a desvantagem é ser uma técnica de elevado custo e necessitar de um maior tempo na realização, além de requerer tecnologia mais avançada (ANDEREG e PASSOS, 1999).

Resultados conflitantes entre RIFI, ELISA e Western blotting foram observados em amostras de soros de baixos títulos, e estes resultados podem refletir alta sensibilidade e baixa especificidade da RIFI associadas com reação-cruzada entre agentes do gênero *Ehrlichia* (O’CONNOR *et al.*, 2006). Cárdenas *et al.* (2007), utilizando os polipeptídeos recombinantes gp36, gp19 e gp200, apresentaram melhorias na capacidade de detecção da tecnologia de proteína recombinante em comparação ao “padrão ouro” da RIFI, eliminando dessa forma os últimos obstáculos associados ao imunodiagnóstico de infecções por *E. canis*, incluindo a identificação

espécie-específica e a falta de sensibilidade associada com baixos níveis de anticorpos no início da fase aguda da infecção.

4.1.4.4 Detecção Molecular

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é altamente sensível e específica no diagnóstico da erliquiose e anaplasose. É utilizada para avaliar a eliminação dos organismos após a terapia antibiótica e sua principal vantagem é identificar a espécie de *Ehrlichia* ou *Anaplasma* envolvida na infecção, o que nem sempre é possível a partir de outras técnicas.

Resultados falso-positivos podem ocorrer quando utilizadas temperaturas de anelamento relativamente baixas, quando contaminantes estão presentes ou quando ocorre amplificação inespecífica. O resultado negativo de PCR denota que nenhum DNA alvo foi encontrado, mas não necessariamente prova que não havia DNA na amostra (resultado falso negativo). A detecção de DNA de *E. canis* pode ser obtida cerca de 4-10 dias após a inoculação (IQBAL *et al.*, 1994). A técnica pode ser realizada a partir de vários genes alvo (16S rRNA, p28, p30, dsb, VirB9), entretanto a PCR para os genes 16S rRNA e p30 são os mais comumente usados. O fato de que *E. canis* contém múltiplas cópias do gene p30, mas somente uma cópia do gene 16S rRNA, aumenta as chances para a detecção do patógeno quando o alvo é o primeiro (STICH *et al.*, 2008).

A PCR convencional é um método que possui alta especificidade e sensibilidade, mas possui algumas limitações como: a possibilidade de contaminação com o brometo de etídio no processamento pós amplificação, os resultados não são quantitativos e a discriminação é baseada apenas no tamanho do fragmento. Além da possibilidade de ocorrer resultados falso-positivos, ocasionados por contaminação do ambiente de trabalho por DNA amplificado em virtude da alta sensibilidade do método. Estas restrições podem ser minimizadas ou até mesmo evitadas com o uso da técnica de PCR em Tempo Real (DO CARMO e FIORINI, 2007).

Outras técnicas derivadas da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo a nested PCR (nPCR), RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism) e real time PCR (qPCR) (MURPHY *et al.*, 1998; WEN *et al.*, 1997; LABRUNA *et al.*, 2007a). Uma análise comparativa entre a PCR (gene dsb) e a nPCR (16S rRNA), realizada em 24 amostras de sangue de cães naturalmente infectados por *E. canis*, demonstrou que as duas técnicas são adequadas ao diagnóstico da EMC (MACHADO, 2004) sendo a nPCR a única capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia* spp. As vantagens adicionais da PCR em etapa única são a redução de falso-positivos devido à contaminação por amplicons da primeira etapa e a diminuição no tempo de execução da técnica (ALVES *et al.*, 2005). qPCR tricolor foi desenvolvida

por Doyle *et al.* (2005), sendo capaz de, em uma única reação, identificar, simultaneamente, erlíquias importantes para a medicina humana, como a *E. chaffeensis*, *E. canis* e *E. ewingii*.

Diversos estudos têm relatado a elevada sensibilidade diagnóstica e analítica da qPCR (DOYLE *et al.*, 2005; GAUNT *et al.*, 2010; HARRUS e WANER, 2011) na detecção de *E. canis* e *A. platys*. A habilidade dessa técnica em detectar DNA erlíquial, indicando infecção ativa, em vez de anticorpos anti-*E. canis*, indicando exposição, constitui um avanço e permite aos clínicos um melhor monitoramento do tratamento instituído, além de permitir a quantificação da carga bacteriana. A probabilidade de contaminação na qPCR é menor do que a PCR convencional. Dessa forma, a qPCR vem se tornando rapidamente o método preferencial para o diagnóstico de *E. canis* (HARRUS e WANER, 2011).

De acordo com Dagnone *et al.*, (2009) o uso de amostras de sangue como material para a realização da PCR pode resultar em falso-negativos, mesmo em animais em fase aguda da doença, visto que a parasitemia do agente é normalmente baixa. Na fase crônica, a detecção de material genômico se torna ainda mais difícil em espécimes menos invasivos, como o sangue. Por outro lado Nakaghi *et al.* (2008) avaliando a sensibilidade da nPCR observaram que a mesma é capaz de detectar DNA de *E. canis* até o equivalente a um monócito infectado em 1036 células, o que torna a técnica altamente recomendada para a detecção de alvos com baixo número de cópias. Gaunt *et al.*, (2010), trabalhando com animais experimentalmente infectados, relataram que amostras de sangue e de punção de linfonodo mostraram-se mais confiáveis que às de punção de medula óssea na detecção de *E. canis* por qPCR.

Amostras obtidas por técnicas mais invasivas como aspirado de baço, na fase crônica da doença, podem aumentar a sensibilidade da técnica de PCR (HARRUS *et al.*, 2004), mas não se apresentam como técnicas viáveis para rotina médica.

4.1.4.5 Cultivo Celular

A utilização bem sucedida de uma linhagem celular de macrófagos canino (DH82) no cultivo de *E. canis* proporcionou o desenvolvimento e padronização da técnica de RIFI, possibilitando avanços na pesquisa e diagnóstico da EMC (LOVERING *et al.*, 1980). No Brasil, a *E. canis* foi isolada em células DH82 a partir do sangue de cães infectados no Rio de Janeiro (TORRES *et al.*, 2002), Jaboticabal (AGUIAR *et al.*, 2007), São Paulo (AGUIAR *et al.*, 2008), Cuiabá, Londrina, Monte Negro, Presidente Prudente (AGUIAR e ORLANDELLI, 2009) e Uberlândia (ALVES, 2010).

O isolamento e crescimento de espécies de *Ehrlichia* é demorado e laborioso sendo mais utilizado em laboratórios de pesquisa e menos como uma ferramenta de diagnóstico. Essa técnica requer equipamentos de laboratório específicos e profissionais treinados. O crescimento inicial do organismo é um processo prolongado, ocorrendo cerca de 10 semanas após a inoculação. *E. canis* também foi adaptada para crescer em linhagem de macrófagos de rato (J774.A1), a qual tem sido sugerida como uma alternativa às células DH82 (Keysary et al., 2001). Além disso, células endoteliais microvasculares humanas (CDC / EU.HMEC-1) foram também úteis para o isolamento de *E. canis* (DAWSON et al., 1993).

4.1.5 Tratamento

Devido à característica de localização intracelular os organismos rickettsiais dificultam a atuação do sistema imune e a resposta humoral torna-se ineficiente. Admite-se que a resposta imune humoral não possui um papel importante na defesa do organismo contra essas infecções, ao contrário, hipóteses indicam que ela possa contribuir para a patogênese da doença já que a grande produção de anticorpos pode gerar deposição de imunocomplexos (HARRUS et al., 1999). A defesa do organismo depende quase que exclusivamente da resposta celular para eliminação do agente. Dessa forma, as terapias antimicrobianas têm sua eficácia bastante reduzida (HARRUS et al., 1999; COHN et al., 2003; PADDOCK et al., 2003).

Cães na fase aguda da infecção respondem bem ao tratamento, no entanto, a eliminação dessa bactéria pode ser difícil e dessa forma os animais tornam-se cronicamente infectados, servindo como reservatórios do microorganismo (STADES, 1999).

Entre as drogas eficazes no tratamento para erliquiose e anaplasnose, as tetraciclina e seus derivados (oxitetraciclina, cloranfenicol, enrofloxacina, imidocarb e doxiciclina) estão entre as que têm maiores probabilidades de eliminar o agente (DOYLE et al., 2005) e são utilizadas na terapia tanto de seres humanos como de animais. Dentre elas, a doxiciclina é considerada a droga de eleição (NEER et al., 2002).

Resultados de PCR negativos foram obtidos após 7 dias de utilização de doxiciclina, na dose de 10mg/Kg por via oral, em cães experimentalmente infectados. Os mesmos foram tratados durante quatro semanas (GAUNT et al., 2010). Davoust et al., (2013) também demonstraram a eficácia da droga em eliminar a infecção por *E. canis*.

Estudo recente desenvolvido por Theodorou et al., (2013) concluiu que a rifampicina, na dose de 10mg/Kg, por via oral, diariamente durante três semanas, foi parcialmente eficaz na eliminação da infecção aguda por *E. canis*, mas acelerou significativamente a resolução

da trombocitopenia. Diante dos resultados a mesma poderia ser considerada como um tratamento antibacteriano alternativo na EMC, especialmente nos cães intolerantes à doxiciclina.

4.2 Babesiose Canina

4.2.1 Agente Etiológico e Classificação

Babesiose é uma doença, de caráter emergente, causada por protozoários do gênero *Babesia* e *Theileria* pertencente à ordem Piroplasmida e filo Apicomplexa. As espécies de *Babesia* são muitas vezes referidas como piroplasmas, um termo coletivo para parasitos protozoários, fenotipicamente semelhantes, que utilizam hemácias de mamíferos em seu ciclo de vida. Duas formas, morfologicamente distintas, do estágio eritrocítico no hospedeiro canino foram reconhecidas nos primeiros estudos que levaram à nomeação das formas maiores, medindo aproximadamente 3-5 μm , como *B. canis*, e menores, (1-3 μm) como *B. gibsoni* (IRWIN, 2009).

B. canis foi reclassificada com base em dados de imunidade cruzada, testes sorológicos, especificidade do vetor e filogenia molecular sendo esses parasitos considerados como espécies separadas. Três sub-espécies foram designadas: *B. canis canis*, prevalente na Europa, *B. canis rossi*, de grande ocorrência no sul da África e *B. canis vogeli*, mais frequentemente observada no norte da África e América do Norte (LEWIS *et al.*, 1996; ZAHLER *et al.*, 1998; CARRET *et al.*, 1999).

4.2.2 Epidemiologia

A transmissão de *Babesia* se dá pela inoculação de esporozoítos (forma infectante) durante o repasto sanguíneo de carrapatos ixodídeos (ALMOSNY, 2002). No hospedeiro vertebrado o protozoário do gênero *Babesia* ataca a membrana do eritrócito e é envolvido por endocitose. No eritrócito, a membrana celular que envolve o parasito se desintegra e todos os estágios subsequentes ocorrem em contato direto com o citoplasma da célula hospedeira. *B. canis* se multiplica dentro do eritrócito por repetidas fissões binárias, originando merozoítos. Até 16 merozoítos de *B. canis* podem ser vistos em um único eritrócito, mas mais comumente se observam únicos ou em pares. Os merozoítos são liberados quando o eritrócito se rompe e podem invadir outros eritrócitos por invaginação (BIRKENHEUER, 2004).

Os carrapatos se infectam pela ingestão de sangue contendo merozoítos durante a sua alimentação nos hospedeiros vertebrados (GREENE, 2006). Um ciclo de vida complexo desse parasito com reprodução sexuada (ALMOSNY, 2002) e envolvendo transmissão transtadial e transovariana resulta na formação dos esporozoítos infectantes nas células das glândulas salivares do carrapato. Quando os carrapatos infectados se alimentam, os esporozoítos passam com a saliva

para a circulação do hospedeiro vertebrado. O carrapato necessita ficar fixado se alimentando no animal por no mínimo de 2 a 3 dias para que a transmissão de *B. canis* ocorra (GREENE, 2006).

No Brasil duas espécies de *Babesia* tem sido relatadas infectando cães, *B. canis vogeli* (PASSOS *et al.*, 2005; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2011) e *B. gibsoni* (TRAPP *et al.*, 2006). *B. canis vogeli* é o piroplasma canino mais difundido devido a natureza cosmopolita de seu hospedeiro, o carrapato marrom do cão, *R. sanguineus*, abundante nos trópicos quentes e úmidos (IRWIN e JEFFERIES, 2004). Inquéritos sorológicos revelaram que a prevalência de anticorpos contra *Babesia* em cães varia de 35,7% (TRAPP *et al.*, de 2006) a 66,9% (RIBEIRO *et al.*, 1990). Investigações parasitológicas mostraram que a prevalência de infecção pode variar de 1,9% (SOARES *et al.*, 2006) para 42,0% (BASTOS *et al.*, 2004).

Pouco se sabe sobre os possíveis fatores de risco para babesiose canina no Brasil. Um estudo em população hospitalar revelou que os cães com mais de 1 ano de vida, vivendo em áreas urbanas e apresentado sangramento superficial são mais propensos a apresentar anticorpos para *B. canis vogeli* (TRAPP *et al.*, 2006). Em outros estudos a babesiose canina tem sido visto mais frequentemente em cães com idade superior a dois anos, embora cães jovens com um histórico recente de visita à praia e primeira exposição a carrapatos também foram vistos afetados pela doença. Não há predileção significativa de gênero ou raça (RIBEIRO *et al.* 1990; GUIMARÃES *et al.*, 2002.; BASTOS *et al.*, 2004; TRAPP *et al.*, 2006).

4.2.3. Sinais Clínicos

Todas as espécies de *Babesia* podem causar pirexia, anorexia, esplenomegalia, anemia e severa trombocitopenia (IRWIN e HUTCHINSON, 1991), além de fraqueza e colapso associado com hemólise intra e extravascular, lesão hipóxica, inflamação sistêmica e pigmentúria (IRWIN, 2009). Embora os episódios hemorrágicos sejam relatados como sinal clínico de babesiose (GUIMARÃES *et al.*, 2002) a possibilidade de coinfeção com *E. canis* deve ser considerada se a hemorragia está presente. Desidratação, perda de peso, dor abdominal e sensibilidade renal a palpação também podem ser observados (BASTOS *et al.*, 2004).

No geral, é aceito, que a espécie de piroplasma menos patogênica ao cão seja *B. canis vogeli*, pelo menos nos animais adultos (IRWIN; HUTCHINSON, 1991), já que em filhotes com menos de 3-4 meses de idade a infecção pode ser fatal (IRWIN, 2009).

4.2.4 Diagnóstico

4.2.4.1 Citologia

A microscopia continua a ser o mais simples e acessível teste de diagnóstico para a maioria dos veterinários e, durante a fase aguda da infecção, é razoavelmente sensível para detectar parasitos intraeritrocitários em esfregaços sanguíneos. A diferenciação entre grandes e pequenos piroplasmas também é relativamente simples. A microscopia ainda é a única opção viável disponível para veterinários em muitas partes do mundo em desenvolvimento, onde a babesiose é endêmica (IRWIN e HUTCHINSON, 1991; BÖHM *et al.*, 2006). A visualização dos piroplasmas em esfregaços sanguíneos confirma o diagnóstico e é suficiente para justificar o tratamento na maioria dos casos, mas as espécies (ou genótipos) do organismo não podem ser determinadas. Para tanto é necessária realização de PCR e sequenciamento (IRWIN *et al.*, 2010).

O diagnóstico em cães cronicamente infectados ou portadores, no entanto, continua a ser um desafio significativo devido à baixa e intermitente parasitemia, nesses casos é necessária a utilização de ferramentas moleculares (IRWIN *et al.*, 2010).

4.2.4.2 Sorologia

Os testes sorológicos são úteis para identificar cães assintomáticos ou portadores e diagnosticar infecções crônicas, nas quais o nível de parasitemia pode ser baixo e o parasito não pode ser detectado em esfregaços de sangue periférico corados. É importante notar, entretanto, que mesmo depois da esterilização terapêutica os cães podem permanecer soropositivos por longos períodos. Assim, o valor diagnóstico dos testes sorológicos é pobre na ausência de sinais clínicos e dados do paciente. A RIFI e o ELISA são considerados ferramentas altamente sensíveis e moderadamente específicas na detecção de anticorpos para *Babesia* em cães (DELL'PORTO *et al.*, 1993; YAMANE *et al.*, 1993; FURUTA *et al.*, 2004).

A RIFI tem sido utilizada para diagnosticar a babesiose canina desde a década de 1970 (ANDERSON *et al.*, 1980; LEVY *et al.*, 1987; YAMANE *et al.*, 1993). Reações cruzadas entre as diferentes espécies de piroplasma podem resultar em especificidade reduzida (LEVY *et al.*, 1987) e anticorpos de algumas espécies de piroplasmas não podem ser detectados por ensaios de IFAT convencionais resultando em uma sensibilidade reduzida e a possibilidade de um diagnóstico falso-negativo se apenas a sorologia é utilizada (BECK *et al.*, 2009; HOLM *et al.*, 2006).

Até o momento não estão disponíveis kits comerciais, baseados na técnica de ELISA, para o diagnóstico rápido de babesiose na clínica como o são para erliquiose e anaplasmose canina, por exemplo, mas há a possibilidade futura. A investigação nesta área tem sido dirigida no sentido de encontrar antígenos imunodominantes específicos de *B. gibsoni* para o uso em ELISA com proteína

recombinante. Recentemente, um novo antígeno (BgP22) revelou boa discriminação entre *B. gibsoni* e *B. canis* spp e parece ser útil em detectar infecções crônicas por *B. gibsoni* (ABOGE *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2007; GOO *et al.*, 2008).

4.2.4.3 Detecção Molecular

Embora a PCR tenha aumentado muito a sensibilidade e especificidade na detecção de *Babesia* e seja bem adequada para estudos epidemiológicos e filogenéticos, o acesso a técnicas moleculares para o diagnóstico da babesiose na rotina clínica ainda está restrito a um número relativamente pequeno de laboratórios em todo o mundo. Os genes de RNA Ribossomal 18S, 5.8S, 28S têm sido utilizados como alvo para o desenvolvimento de PCR convencional (IRWIN, 2010).

Considerando que o limite de detecção, para o exame de microscopia de luz, se limita a cerca de 0,001% de parasitemia, a PCR é capaz de detectar cargas de parasito próximo a 50 organismos por mililitro (ml) de sangue (BIRKENHEUER *et al.*, 2003) e 9 organismos por ml (MATSUU *et al.*, 2005). Resultados falso-negativos podem ocorrer em casos crônicos de babesiose e é muito importante reconhecer essa limitação quando na triagem de prováveis portadores e outros cães assintomáticos, como os doadores de sangue (IRWIN, 2009). A capacidade da PCR para detectar cães infectados em tais situações, com e sem tratamento, tem sido investigada (BIRKENHEUER *et al.*, 2004; JEFFERIES *et al.*, 2007). Spolidório *et al.* (2011) detectaram DNA de *Babesia* spp. em cães no município de Cuiabá, estado do Mato Grosso, e por sequenciamento as amostras positivas revelaram 100% de identidade com *B. canis vogeli*.

RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism) e nPCR foram utilizados na diferenciação entre *B. vogeli* e *B. gibsoni* em estudo na Austrália (JEFFERIES *et al.*, 2007) e também entre as espécies das grandes babesias e *B. gibsoni* em outras regiões endêmicas (BIRKENHEUER *et al.*, 2003). Recentemente Moraes *et al.* (2014) propuseram uma otimização na detecção molecular de *B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi* ou *B. gibsoni* com base em uma única *semi-nested* PCR (snPCR), como uma forma de prevenir resultados falso-negativos devido às baixas taxas de parasitemia.

4.2.5. Tratamento

Um tratamento para a piroplasmose 100% seguro e eficaz não está disponível, e a maioria, se não todos, os cães tratados com drogas antibabesias específicas são improváveis de serem curados da infecção. Um cão no qual foi confirmada a infecção deve ser considerado potencialmente infectado por toda a vida, apesar do tratamento específico e remissão dos sinais clínicos (IRWIN, 2010).

As drogas de escolha para o tratamento da Babesiose são os derivados da Diamidina: Aceturato de Diminazeno, Isotionato de Pentamidina e Dipropionato de Imidocarb (ALMOSNY *et al.*, 2002; IRWIN, 2009). Entre essas o Dipropionato de Imidocarb é a droga mais utilizada rotineiramente em pequenos animais (VIDOTTO e TRAPP, 2004), tem efeito direto sobre o parasito, alterando a forma do núcleo e a morfologia do citoplasma (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002), apresenta baixa toxicidade, e alta propriedade curativa e profilática contra a *B. canis* (ABDULLAHI e SANNUSI, 1988).

4.3 Hepatozoonose Canina

4.3.1 Agente Etiológico e Classificação

A Hepatozoonose canina tem sido diagnosticada em muitas regiões do mundo, é uma doença transmitida pela ingestão de carrapatos, ou partes deles, infectados por oocistos maduros de *Hepatozoon* spp., (BANETH *et al.*, 2001; PALUDO *et al.*, 2005).

O gênero *Hepatozoon* Miller, 1908, é classificado no filo Apicomplexa, subordem Adeleorina, família Hepatozoidae (Wenyon, 1926). A subordem Adeleorina é caracterizada pelo desenvolvimento de macro e microgametas no interior da célula hospedeira, ausência de endodiogenia e formação de oocistos com esporocistos e esporozoítos (BARTA, 1989).

Atualmente, duas espécies de *Hepatozoon*, que são conhecidas por infectar cães domésticos, foram descritas: *H. canis* (PALUDO *et al.*, 2005.) a qual pode causar infecção subclínica e inaparente e *H. americanum* (BANETH *et al.*, 2000) que geralmente é letal. A primeira é responsável por todos os casos brasileiros relatados em cães domésticos e a segunda responsável pelos casos na América do Norte (SPOLIDÓRIO *et al.*, 2011). Esta classificação foi baseada principalmente em sinais clínicos, tropismo tissular, resultados morfológicos e patológicos, bem como por características antigênicas e genéticas (VICENTE-JOHNSON *et al.*, 1997; BANETH *et al.*, 2000).

4.3.2 Epidemiologia

Após a ingestão de carrapatos infectados, os esporozoítos se difundem através do sangue e da linfa para vários órgãos, incluindo o baço, medula óssea, pulmão, fígado e rim. Nesses órgãos os merontes são formados e passam por vários ciclos de merogonia, liberando merozoítos, os quais invadem os glóbulos brancos (principalmente neutrófilos e monócitos) onde formam os gamontes. Quando os carrapatos realizam repasto sanguíneo em um cão infectado, os gamontes ingeridos são liberados dos leucócitos no intestino do mesmo, associados aos pares e diferenciados em gametas.

A fertilização é seguida pela formação de um zigoto, o qual passa por um processo chamado de esporogonia, para formar oocistos maduros na hemocele do hospedeiro invertebrado (BANETH *et al.*, 2001; 2003; 2007) como ilustrado na figura 2.

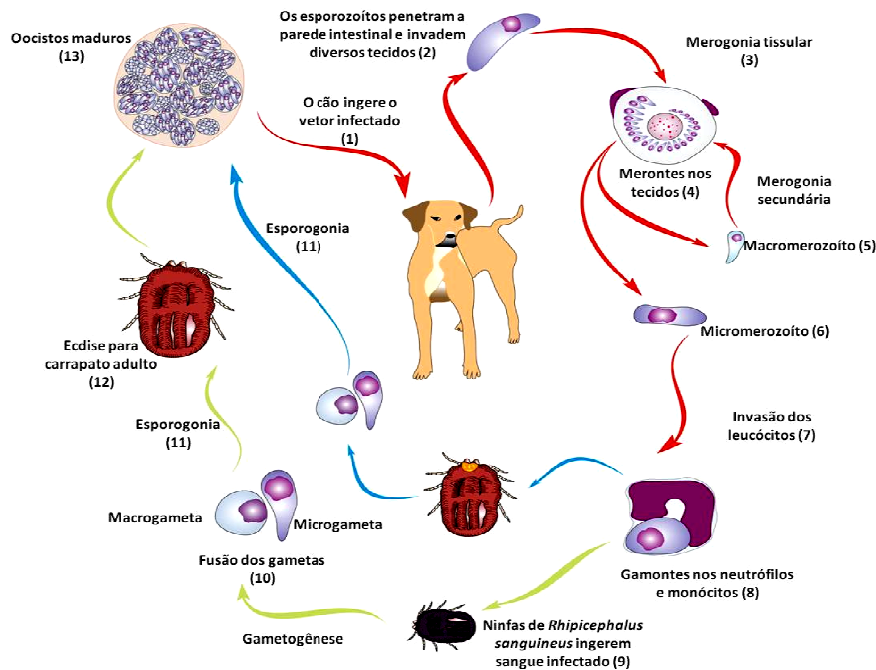


Figura 2- Ciclo de vida do *Hepatozoon canis* (O'DWYER, 2011).

O carrapato marrom do cão, *R. sanguineus*, é o principal vetor de *H. canis* (CHRISTOPHERS *et al.*, 1907; BANETH *et al.*, 2001), embora oocistos desse protozoário também tenham sido detectados em outras espécies de carrapatos parasitando cães, incluindo *Haemaphysalis longicornis* e *H. flava* no Japão (MURATA *et al.*, 1991) e *Amblyomma ovale* no Brasil (FORLANO *et al.*, 2005; RUBINI *et al.*, 2009).

A patogenia da hepatozoonose canina está relacionada às lesões em vários tecidos, particularmente na musculatura estriada, inclusive a cardíaca, onde o parasito realiza merogonia. Neste contexto, pode ocorrer uma importante miosite piogranulomatosa, seguida da liberação dos merozoítos, enquanto tecidos conjuntivo e adiposo são menos frequentemente parasitados (PANCIERA *et al.*, 1998). Os merozoítos se difundem fartamente por tecidos hemolinfáticos, mas não nos músculos (BANETH *et al.*, 2003). Hepatite secundária à agressão tissular por parte do protozoário é comum (O' DWYER e MASSARD, 2001).

H. canis tem sido diagnosticado em diversas regiões do mundo como África, Ásia, Europa e Américas. No Brasil, infecção por *H. canis* tem sido relatada em muitos estados, incluindo o Distrito Federal (PALUDO *et al.*, 2003), Espírito Santo (MASSARD, 1979; SPOLIDORIO *et al.*, 2009), Goiás (MUNDIM *et al.*, 2008a), Mato Grosso (SPOLIDÓRIO *et al.*, 2011), Mato Grosso do Sul (SALGADO, 2006), Minas Gerais (MUNDIM *et al.*, 2008b), Rio de Janeiro (MASSARD, 1979; O'DWYER *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2007), Rio Grande do Sul (MASSARD, 1979; LASTA *et al.*, 2009), São Paulo (GONDIM *et al.*, 1998; RUBINI *et al.*, 2005; O'DWYER *et al.*, 2006) e, mais recentemente, Pernambuco (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2010) e Rio Grande do Norte (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Segundo os trabalhos publicados por diversos autores *H. canis* está presente em todas as regiões do Brasil, mas sua prevalência é muito variável, dependendo do estado, origem dos animais (cães de áreas rurais ou urbanas) e a metodologia de diagnóstico empregada (O'DWYER, 2011).

Em Anápolis, estado de Goiás, a infecção foi detectada por exame de esfregaço sanguíneo em apenas um (5,56 %) de 53 cães examinados (MUNDIM *et al.*, 2008a). Ramos *et al.* (2010) estudando patógenos transmitidos por carrapatos em cães na região metropolitana de Recife, estado de Pernambuco, constataram que apenas 0,49% (1/ 205) estava infectado com *H. canis*, por meio do teste de PCR. Prevalência alta desse patógeno foi encontrada por alguns autores quando os estudos foram realizados em cães de áreas rurais. No estado do Rio de Janeiro, O'Dwyer *et al.* (2001) identificaram, por esfregaço sanguíneo, 39,2% de animais infectados por *H. canis* e, Rubini *et al.* (2008), em pesquisa molecular e parasitológica, identificaram 11,3% e 53,3%, respectivamente, animais positivos em área rural do estado de São Paulo. Entretanto Spolidorio *et al.*, (2009), no estado do Espírito Santo, encontraram uma taxa de infecção geral de 58,7% (54/ 92) e não houve associação significativa entre os cães positivos de áreas urbanas ou rurais.

4.3.3. Sinais Clínicos

A doença geralmente não é diagnosticada corretamente pela maioria dos veterinários, visto que os sinais clínicos gerais são semelhantes aos de outras doenças transmitidas por carrapatos tais como erliquiose e babesiose (MURATA *et al.*, 1991). Quando ocorre em co-infecção com outras doenças infecciosas, como a erliquiose (MYLONAKIS *et al.*, 2004) e babesiose, a hepatozoonose pode desenvolver um quadro clínico mais severo e de prognóstico variável, com uma sintomatologia exacerbada e inespecífica, com pirexia, anorexia, perda de peso, corrimento ocular, dor, diarreia, êmese, poliúria e polidipsia, podendo ser acompanhada de anemia grave (O' DWYER e MASSARD, 2001). Desta maneira, a infecção por *H. spp.* caracteriza-se por causar doença

secundária à imunossupressão, não demonstrando sinais clínicos que a caracterizem ou a indiquem como sendo uma doença primária.

4.3.4. Diagnóstico

4.3.4.1. Citologia

A infecção por *H. canis* é frequentemente diagnosticada por meio de exame de esfregaço de sangue, a fim de se detectar gamontes dentro de neutrófilos ou monócitos (BANETH *et al.*, 2003). Os gamontes são grandes (11,0 × 5,0 milímetros), de forma elipsoidal, com uma cápsula e um núcleo grande e central (WANER *et al.*, 1994). Ambos, neutrófilos e monócitos, podem ser parasitados e sofrer modificações morfológicas causadas pelo parasito (MAKIMURA e KINJO, 1991; MURATA *et al.*, 1993). Aspirados de medula óssea podem revelar esquizontes em diferentes fases de desenvolvimento permitindo, assim, o diagnóstico parasitológico ante-mortem, em cães com baixa parasitemia (BANETH *et al.*, 2007). Recentemente, Otranto *et al.* (2011) sugeriram que a avaliação citológica em papa leucocitária é um teste mais sensível do que a avaliação de esfregaço sanguíneo.

Os gamontes de *H. canis* aparecem na circulação após merogonia nos tecidos, e os cães infectados podem apresentar parasitismo latente por longos períodos de tempo (BANETH e WEIGLER, 1997). De acordo com O'Dwyer (2011) cães infectados os quais são mantidos livres de carrapatos e, conseqüentemente, não expostos à reinfecção apresentam parasitemia altamente variável que, por vezes, é detectável e às vezes não. Além disso, em alguns cães infectados os gamontes circulantes desapareceram, de tal forma, que eles não são detectados em vários exames de esfregaço de sangue ou em PCR. No entanto, não é possível afirmar se estes cães eliminaram a infecção ou se a mesma persiste com parasitemia extremamente baixa.

Cães com infecção latente, quando expostos a infecções concomitantes ou situações de imunossupressão, podem apresentar reativação dos esquizontes teciduais, resultando no aumento da parasitemia e aparecimento de manifestações clínicas (BANETH e WEIGLER, 1997).

De acordo com Otranto *et al.*, (2011) quando a PCR não estiver disponível a citologia em papa leucocitária deve ser escolhida visando a detecção de *H. spp* em esfregaço sanguíneo canino. A citologia é um método de diagnóstico fácil e prático, mas a morfologia e morfometria dos gamontes não permitem a diferenciação entre as espécies. Além disso, este não é um teste sensível, visto que os gamontes não podem ser detectados quando a parasitemia é muito baixa ou intermitente (BANETH *et al.*, 1998).

4.3.4.2 Sorologia

A detecção de anticorpos para *H. canis* pode ser útil quando cães infectados apresentam baixa parasitemia ou foram infectados recentemente, antes da formação dos gamontes (BANETH *et al.*, 1998). Shkap *et al.* (1994) descreveram uma RIFI com base na detecção de anticorpos que foram reativos aos gamontes de *H. canis*. Essa técnica foi capaz de detectar IgM em cães 16-39 dias após a infecção e IgG 22-43 dias após, confirmando assim a sua aplicabilidade como um teste de diagnóstico para estudos de soroprevalência (BANETH *et al.*, 1996; BANETH *et al.*, 1998; INOKUMA *et al.*, 1999; KARAGENC *et al.*, 2006).

Baneth *et al.* (2000) desenvolveram uma técnica visando a purificação de gamontes de *H. canis* a partir de neutrófilos de sangue periférico, permitindo assim a avaliação de características antigênicas por meio de Western blotting. Essa técnica confirmou as diferenças antigênicas entre *H. canis* e *H. americanum* em cães. Os gamontes purificados também foram utilizados para desenvolver e avaliar um teste ELISA o qual apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 97% comparável à RIFI (GONEN *et al.*, 2004; MYLONAKIS *et al.*, 2005). De acordo com O'Dwyer (2011) embora estes métodos sorológicos possam ser valiosos em estudos epidemiológicos e no diagnóstico de cães infectados, eles precisam de uma fonte de antígeno consistente a partir de animais com elevada parasitemia, tais como aqueles utilizados por Shkap *et al.* (1994) porém, no Brasil, é extremamente raro encontrar cães altamente infectados.

4.3.4.3 Detecção Molecular

Rubini *et al.* (2005) e Paludo *et al.* (2005) são os responsáveis pela caracterização molecular das espécies de *Hepatozoon* em cães no Brasil. Rubini *et al.* (2005) analisaram as seqüências parciais de genes 18S rRNA a partir do sangue de 31 cães de áreas rurais do estado de São Paulo e, das 21 amostras positivas, eles sequenciaram os produtos de PCR de oito. Os resultados indicaram que as espécies caninas de *Hepatozoon* do Brasil eram geneticamente relacionadas às espécies japonesas, as quais foram identificadas como *H. canis*. Paludo *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes após sequenciar amostras de três cães infectados em Brasília.

A técnica de PCR, utilizando-se o gene que codifica a porção 18S ribossomal como alvo, vem sendo descrita em alguns estudos recentes de detecção de *H. spp.* no Brasil (LASTA *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2011; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2014) e apresentando-se como uma técnica de diagnóstico bastante sensível. Segundo O'Dwyer (2011) as espécies de *Hepatozoon* foram eficientemente detectadas em cães naturalmente e experimentalmente infectados apenas quando primers gênero-específicos foram utilizados, e as seqüências obtidas foram alinhadas com as seqüências de *H. canis* já existentes. Otranto *et al.* (2011) sugeriram que a PCR a partir de

papa leucocitária e sangue total seria o melhor ensaio diagnóstico para detectar a infecção por *H. canis* em cães.

4.3.5. Tratamento

Muitas drogas, incluindo o dipropionato de imidocarb, antibióticos e agentes anticoccidianos têm sido utilizadas para tratar a infecção por *H. canis* em cães. Nenhum medicamento permite a eliminação completa do microrganismo, por isso podem ocorrer reicidivas (NELSON e COUTO, 2003).

A droga de escolha tem sido o imidocarb, embora os resultados de tratamento com esse fármaco tenham sido inconsistentes (PASA *et al.*, 2011). Sasanelli *et al.* (2010) estudaram a eficácia do dipropionato de imidocarb para o tratamento da infecção por *H. canis* e demonstraram por métodos parasitológicos e avaliação molecular que o mesmo não conseguiu eliminar o parasito.

Entretanto, quando associado à tetraciclina ou à doxiciclina o imidocarb tem mostrado resultados satisfatórios. Baneth *et al.*, (2003) sugeriram a administração de 5-6mg/Kg de Imidocarb, por via subcutânea ou intramuscular, a cada 14 dias até o desaparecimento dos gamontes da circulação, ao mesmo tempo em que fosse administrado doxiciclina na dose de 10mg/kg, por via oral, durante 21 dias visando tratar co-infecções também transmitidas por carrapatos.

Recentemente De Tommasi *et al.* (2014) avaliaram a eficácia do dipropionato (5-6 mg / kg por via subcutânea uma vez por semana durante 6 semanas), e de toltrazuril / emodepsida (Procox®, 15 mg / kg uma vez por dia durante 6 dias) em associação com clindamicina (15 mg / kg uma vez por dia durante 21 dias) em cães naturalmente infectados por *H.canis*, os resultados indicaram que, apesar de uma redução no percentual de cães infectados, ambos os tratamentos não oferecem cura parasitológica. Consequentemente, novos protocolos de tratamento ou compostos ativos contra *H. canis* devem ser investigados.

Na maioria dos casos, o tratamento com antiinflamatórios pode ser o aspecto mais útil do tratamento. Marchetti *et al.* (2009) trataram um cão infectado por *H. canis*, apresentando envolvimento esquelético e meningoencefalomielite, utilizando dipropionato de imidocarb e prednisona, o que levou à melhora do quadro clínico.

O tratamento é frustrante porque nenhum regime terapêutico tem sido bem sucedido na cura da infecção pelo parasito, embora a recuperação clínica seja conseguida. É preciso lembrar que as drogas usadas no tratamento de infecções por *H. canis* são eficientes na eliminação de outros patógenos, como *Babesia*, *Ehrlichia* e coccídios. Portanto, a melhora clínica pode estar ocorrendo por causa da eliminação da infecção concomitante, produzindo, assim, a recuperação clínica, e não por causa da ação sobre o *Hepatozoon* (O'D'WYER, 2011).

4.4 Febre Maculosa

4.4.1 Agente Etiológico e Classificação

Rickettsioses são doenças causadas por bactérias da família Rickettsiaceae na qual está classificado o gênero *Rickettsia*. Os organismos da família Rickettsiaceae, ao contrário dos pertencentes à família Anaplasmataceae, crescem livres no citoplasma das células do hospedeiro (DUMLER *et al.* 2001). Em seres humanos causam as doenças conhecidas como Tifo endêmico, Tifo epidêmico e Febre Maculosa, sendo somente essa última, importante para os canídeos (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

Estas bactérias são gram-negativas, com ciclo de vida intracelular obrigatório. As espécies desse gênero são divididas em dois grupos tendo como base características antigênicas, morfológicas, moleculares e ecológicas: Grupo Tifo (GT) composto por *R. prowazekii* e *R. typhi*, cujo os vetores são piolhos e pugas, respectivamente, e o Grupo da Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 20 espécies, sendo a maioria transmitida por carrapatos, com exceção de *R. akary* e da *R. felis*, cuja transmissão está associada a ácaros e pulgas, respectivamente. (STOTHARD *et al.*, 1994; ROUX *et al.*, 1997; PAROLA *et al.*, 2005).

R. rickettsii, agente da Febre Maculosa Brasileira (FMB), é o principal agente etiológico do GFM e a espécie mais patogênica do gênero, infectando cães e seres humanos em áreas endêmicas em todo o mundo, podendo haver variação quanto à virulência dos genótipos circulantes da bactéria (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003; PAROLA *et al.*, 2009).

4.4.2 Epidemiologia

Até o ano de 2000 apenas uma espécie, *Rickettsia rickettsii*, incluída no GFM, era reconhecida no Brasil, mas a partir daí foi verificada a ocorrência de outras espécies: *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis* (LABRUNA *et al.*, 2011). As riquetsias do GFM estão distribuídas mundialmente e são transmitidas principalmente por carrapatos, com necessidades ecológicas específicas o que torna a epidemiologia das rickettsioses diretamente ligada a distribuição geográfica de cada carrapato vetor (SAZBÓ *et al.*, 2013).

Até o momento os únicos agentes implicados em doença em seres humanos no Brasil, transmitidos por carrapatos, são *R. rickettsii* (ANGERAMI *et al.*, 2006) e *R. parkeri* (SPOLIDORIO *et al.*, 2010). A patogenidade de *R. amblyommii* ainda não está bem esclarecida, mas alguns casos presumivelmente causados por *R. rickettsii* nos Estados Unidos podem ser atribuídos a infecção por *R. amblyommii* (APPERSON *et al.*, 2008).

A transmissão da riquetsia se dá pela picada do carrapato em qualquer uma de suas fases (larva, ninfa e adulto). Para que o carrapato transmita a doença, é necessário que fique aderido à pele, se alimentando, por um período de 6 a 10 horas. Ao picar, e após se alimentar, o carrapato transmite o microrganismo por meio de suas glândulas salivares. É importante notar que as picadas das larvas e das ninfas, por serem menos dolorosas, são as que têm a maior probabilidade de transmitir o microrganismo, pois o ser humano não percebe a picada e permite que ocorra a transmissão. A picada do adulto, por ser muito dolorida, prontamente é percebida, e pode-se retirar o carrapato a tempo de não transmitir a doença. Outra forma de contágio se dá pelo esmagamento do carrapato quando é retirado, liberando seu conteúdo gástrico (CHEN *et al.*, 2008).

A partir da picada do carrapato infectado, a riquetsia se dissemina pelo organismo via vasos linfáticos e pequenos vasos sanguíneos, atingindo pele, cérebro, pulmões, coração, fígado, baço, pâncreas e trato gastrointestinal (WALKER *et al.*, 2003). Em todos os tecidos atingidos, a riquetsia invade o endotélio vascular, onde se replica para atingir células da musculatura lisa levando à vasculite, necrose vascular e hemorragias, com consequente ativação da cascata de coagulação, desencadeando um consumo destes fatores e desencadeando um quadro de coagulação intravascular disseminada (CID). Os sinais clínicos iniciam-se com febre, edema e hiperemia/hemorragia nos lábios e extremidades, vômitos, diarreia, anorexia, evoluindo para púrpuras e alterações neurológicas, sensibilidade dos linfonodos, articulações e músculos (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

Diversos gêneros de carrapatos, incluindo *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Amblioma*, são importantes reservatórios de *R. Rickettsii* na natureza (BURGDORFER, 1988). Tais carrapatos desempenham esse papel devido à capacidade de transmitir a bactéria transovariamente e transtadialmente. Assim, o carrapato permanece infectado durante toda a vida e é capaz de disseminar o organismo para as novas gerações. Entretanto, apenas esse mecanismo não é suficiente para manter a bactéria ativa ao longo do tempo, tendo em vista o efeito deletério que a mesma causa nos carrapatos (McDADE e NEWHOUSE, 1986).

Acredita-se que alguns animais vertebrados - hospedeiros naturais de carrapatos vetores potenciais – devam assumir um papel fundamental na manutenção do patógeno na natureza, atuando como hospedeiros amplificadores da infecção por *R. Rickettsii* na população de carrapatos. Ao manter riquetsemia durante dias ou semanas, o hospedeiro amplificador possibilita a infecção de carrapatos antes não infectados e, assim, aumenta a infecção por *R. Rickettsii* na população desses ixodídeos (BURGDORFER, 1988).

No Brasil, diferentes trabalhos realizados desde a década de 30 apontam as capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*) e os gambás (*Didelphis spp.*) como amplificadores de *R. rickettsii*

para *A. cajennense* (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935; TRAVASSOS e VALLEJO, 1942; PIRANDA *et al.*, 2008; HORTA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2009). Além desses animais, também já foram indicados o cão doméstico (*Canis familiaris*); o cachorro do mato (*Dusicyon* sp., sin. *Canis brasiliensis*); o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*, sin. *Sylvilagus minensis*); o preá (*Cavia aperea*); e a cutia (*Dasyprocta azarae*) (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935).

É provável que o convívio entre cães e seres humanos represente um risco para a infecção humana, devido ao estreito contato com os carrapatos (GORDON *et al.*, 1984). Além disso, os cães são hospedeiros amplificadores desses artrópodes, aumentando o número de vetores infectados no ambiente (RAOULT e PAROLA, 2007). Sabe-se, ainda, que o risco de contato com o patógeno é mais elevado em cães do que em seres humanos, tendo em vista a maior exposição dos animais a carrapatos vetores competentes (SCORPIO *et al.*, 2008). Na condição de hospedeiro para os carrapatos vetores da FMB, o cão pode ser utilizado como importante sentinela em estudos de vigilância epidemiológica. Segundo Lemos *et al.* (1997), a prevalência de reações sorológicas positivas em cães de uma área geográfica evidencia o risco de infecção humana.

A ocorrência da FMB em seres humanos já havia sido reconhecida desde a década de 1920 em diferentes estados brasileiros, com maior prevalência encontrada em Minas Gerais (GALVÃO, 1988; LEMOS *et al.*, 1994; CALIC, 1998) e São Paulo (MELLES *et al.*, 1992; LEMOS *et al.*, 1996; LEMOS *et al.*, 2001). Atualmente a enfermidade é considerada uma zoonose reemergente no Brasil e de grande impacto para a saúde pública, devido à dificuldade de diagnóstico e à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (GRECA *et al.*, 2008).

A doença clínica em cães foi descrita apenas recentemente no país, a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo (LABRUNA *et al.*, 2009a), destacando a gravidade da infecção e a dificuldade de diagnóstico na população canina. Melo *et al.*, (2011) e Spolidório *et al.*, (2013) identificaram cães, oriundos de zona rural e urbana, soropositivos para *Rickettsia* spp. nos estados de Mato Grosso e Amazonas, respectivamente.

4.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico da FMB em cães é baseado na observação de sinais clínicos e na confirmação laboratorial por meio de métodos diretos e/ou indiretos. É fundamental associar o diagnóstico laboratorial com a situação e os antecedentes epidemiológicos da região, a procedência do caso suspeito e a época do ano, para diferenciação de outras enfermidades (GASSER *et al.*, 2001).

4.4.3.1 Cultivo Celular

Devido a pouca viabilidade das riquetsias para isolamento, as amostras devem ser colhidas antes do início da antibioticoterapia, mantidas em refrigeração e submetidas ao procedimento no menor intervalo de tempo possível (MARRERO e RAOULT, 1989; NASCIMENTO, 2003). As amostras incluem plasma, triturado de coágulo, biópsia de pele, tecidos de necropsia e mesmo os artrópodes (LABRUNA, 2006). O cultivo é feito principalmente de células Vero, associado ou não à técnica de “shell vial”, com a penetração do agente no interior da célula. Com o isolamento por “shell vial”, são obtidos resultados positivos durante a fase de riquetsemia, antes da soroconversão, sendo útil no diagnóstico de casos agudos (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

O inconveniente para o paciente é a demora que decorre entre a coleta da amostra e o diagnóstico. O diagnóstico definitivo por meio dessa técnica demora cerca de 15 dias, em virtude do tempo de execução da técnica (MARRERO e RAOULT, 1989; NASCIMENTO, 2003).

4.4.3.2 Sorologia

A RIFI é atualmente o teste de escolha para o diagnóstico sorológico de infecção rickettsial em seres humanos e animais sendo recomendada como padrão-ouro pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (figura 3), mas reação cruzada entre as espécies de *Rickettsia* é frequentemente observada, dificultando a identificação das espécies envolvidas na infecção (BREITSCHWERDT *et al.*, 1988; LA SCOLA *et al.*, 1997; PAROLA *et al.*, 2005; GALVÃO *et al.*, 2005). Em geral, só é possível detectar anticorpos anti-riquetsiais após a segunda semana do início da doença. Portanto, o diagnóstico definitivo poderá ser tardio em alguns casos (LA SCOLA e RAOULT, 1997). Para a confirmação diagnóstica, é necessário uma elevação de quatro vezes no título de anticorpos em amostras pareadas. Alternativamente, um título único maior que 1.024 também pode ser considerado indicativo de infecção (GASSER *et al.*, 2001).

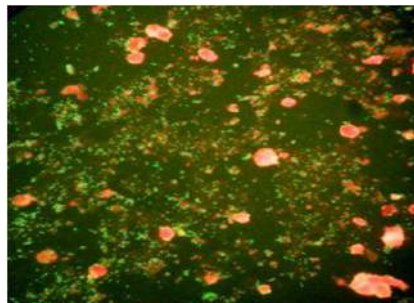


Figura 3- RIFI para detecção de anticorpos caninos contra *Rickettsia rickettsii* (Arquivo pessoal).

Segundo La Scola *et al.*, (1997) e Parola *et al.*, (2005) o ideal é sempre testar a amostra para espécies de *Rickettsia* de ocorrência conhecida na região, porque os títulos de anticorpos homólogos são sempre superiores aos títulos de anticorpos heterólogos. Em alguns casos as diferenças nos títulos podem ser altas o suficiente para diferenciar as espécies rickettsiais envolvidas na estimulação da resposta imune.

Quando uma amostra de soro é submetida a uma bateria de testes frente a variados antígenos de *Rickettsia* spp., as diferenças entre os títulos de anticorpos são, em alguns casos, grandes o suficiente para indicar a espécie de riquetsia que estimulou a resposta imune (PINTER *et al.*, 2008). Ao apresentar um título final de anticorpos contra determinada espécie de *Rickettsia* pelo menos quatro vezes maior que o observado para quaisquer outra espécie, considera-se o soro homólogo à primeira espécie testada ou de genótipo muito estreitamente relacionado. Esse critério vem sendo utilizado em várias pesquisas sorológicas utilizando animais sentinelas no Brasil, para determinar o provável agente causador da infecção (PINTER *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2011; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2013).

Outros métodos sorológicos foram utilizados para o diagnóstico de riquetsioses, mas não são de fácil reprodução, a exemplo dos métodos de ELISA e Western-blotting. Eles necessitam da purificação dos antígenos a serem utilizados, e com isso, dificultam sua utilização por muitos laboratórios de saúde pública. O Western-Blotting é considerado mais sensível do que a RIFI, pois detecta anticorpos IgM precocemente. Teoricamente é mais específico, sendo aconselhado em inquéritos epidemiológicos no esclarecimento da real prevalência da infecção. Entretanto, a quantidade e pureza de antígeno impedem sua utilização rotineira (NASCIMENTO, 2003).

4.4.3.3 Detecção Molecular

As técnicas de biologia molecular usadas na detecção e identificação de riquetsias são baseadas na PCR, PCR associada à RFLP e PCR com sequenciamento. A PCR fornece resultados rápidos e é a prova de eleição para um diagnóstico precoce, fornecendo resultado antes da soroconversão e em pacientes previamente tratados. A espécie e o gênero do agente podem ser determinados por meio de sequenciamento e análise das bases dos produtos amplificados pela PCR. A PCR/RFLP apresenta resultados reprodutíveis, entretanto, o mesmo perfil eletroforético é observado em muitos isolados, dificultando a identificação das diferentes espécies do GFM (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

É importante citar que a detecção de *Rickettsia* spp. em sangue de animais vertebrados normalmente é rara, uma vez que o período de bacteremia dura apenas alguns dias ou semanas e, posteriormente, a bactéria não é mais encontrada no sangue (BURGDORFER, 1988). O período de

bacteremia da *R. rickettsii* já foi demonstrado em cães, com detecção do agente somente até 10 dias após infecção experimental (KIDD *et al.*, 2008). Além disso, *Rickettsia* spp. infecta as células endoteliais dos animais, apresentando assim uma concentração muito baixa no sangue, dificultando a detecção por análise molecular (LA SCOLA e RAOULT, 1997).

4.4.4 Tratamento

O tratamento da FMB em cães é realizado com antibioticoterapia específica e seu sucesso está diretamente ligado ao achado da infecção no seu início. Assim, a terapia antimicrobiana deve ser iniciada imediatamente após a suspeita clínica/epidemiológica (RAOULT *et al.*, 2005). Os fármacos de eleição para o tratamento da enfermidade nos cães são as tetraciclina, doxiciclina ou cloranfenicol (FORTES *et al.*, 2011).

Drogas lipossolúveis, como doxiciclina, têm se mostrado mais efetivas, demonstrando ter menos reações adversas no tratamento da enfermidade e são consideradas de eleição para todos os pacientes suspeitos ou confirmados. Pesquisas a partir de cães com FMMR mostraram a eficácia dessa droga no tratamento da doença (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999). O tratamento precoce com doxiciclina (20 mg/Kg, via oral ou intravenosa, a cada 12 horas por uma semana) melhora o prognóstico dos cães, com uma rápida resposta em um a dois dias (RAOULT e PAROLA, 2007).

Josamicina e novos compostos macrolídeos, como claritromicina e azitromicina, podem representar alternativas para o tratamento de algumas Rickettsioses, especialmente em mulheres grávidas, sob rigoroso acompanhamento e na ausência de doença grave. A telitromicina também parece ser altamente ativa *in vitro*, mas *in vivo* faltam dados, portanto, esses medicamentos devem ser melhor avaliadas (BOTELHO-NEVERS *et al.*, 2012). Em qualquer caso, a terapia antibiótica empírica precoce deve ser prescrito a qualquer suspeita de Rickettsioses transmitida por carrapatos antes da confirmação do diagnóstico (PAROLA *et al.*, 2013).

4.5 Principais vetores envolvidos na transmissão de hemoparasitoses

A fauna de carrapatos brasileiros compreende 62 espécies distribuídas em nove gêneros (DANTAS-TORRES *et al.*, 2009; LABRUNA e VENZAL, 2009). Os vetores dos organismos pertencentes ao gênero *Ehrlichia* são os carrapatos ixodídeos (RIKIHISA, 1991). Para *E. canis* o carrapato marrom do cão, *R. Sanguineus* (figura 4) tem sido reconhecido como vetor da EMC em muitas partes do Brasil (VIEIRA *et al.*, 2011) e há possibilidade de que essa espécie também possa estar relacionada à transmissão de *A. platys* (DAGNONE *et al.*, 2009). A ocorrência de *R.*

sanguineus parasitando humanos no Brasil serve de alerta para o risco de transmissão de tais patógenos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2009).



Figura 4- Fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* em oviposição (A) e realizando repasto sanguíneo em um cão (B) (DANTAS-TORRES, 2010).

R. sanguineus transmite *E. canis* tanto transestadialmente quanto intraestadialmente (STICH *et al.*, 2002). Bremer *et al.* (2005) demonstraram que carrapatos machos adultos podem se infectar e transmitir a doença a vários cães de um mesmo ambiente sem a presença de fêmea. Apesar do *R. sanguineus* adulto não ser um verdadeiro reservatório para *E. canis* (pelo fato de não haver transmissão transovariana), este é capaz de a transmitir até 155 dias após o destacamento do hospedeiro. No entanto, é indispensável a existência de canídeos infectados para manter o parasito na população de carrapatos (TRAPP *et al.*, 2006).

Os principais vetores da babesiose canina são os ixodídeos *R. sanguineus*, *Dermacentor reticulatus*, e *Haemaphysalis elliptica*, tendo cada subespécie de *B. canis* patogenicidade e vetores próprios. *R. sanguineus* parece ser o principal vetor de transmissão de *B. canis vogeli*. Já *D. reticulatus* parece estar mais implicado na transmissão de *B. canis canis* e *H. elliptica* na de *B. canis rossi* (IRWIN *et al.*, 2009; OYAMADA *et al.*, 2005).

R. sanguineus também tem sido incriminado como veículo de transmissão de *H. canis* e sua presença em cães foi associada com a infecção do patógeno (SPOLIDORIO *et al.*, 2009), no entanto, até o momento, não há nenhum relato no Brasil acerca de *R. sanguineus* natural ou experimentalmente infectado por *H. canis* (FORLANO *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2010). De acordo com Moraes-Filho *et al.* (2011), estes resultados negativos devem estar relacionadas com as diferenças entre a espécie no Brasil e em outras regiões do mundo. Por outro lado estudos apresentaram evidências de que *Amblyomma ovale* seria um vetor natural para *H. canis*, já que esse carrapato foi encontrado naturalmente infectado e é capaz de adquirir e transmitir esse patógeno para os cães (FORLANO *et al.*, 2005; RUBINI *et al.*, 2009).

No Brasil duas espécies de carrapatos são incriminadas como transmissores da *R. rickettsii* aos homens e aos animais: *A. cajennense* e *A. aureolatum* (DIAS e MARTINS, 1939; PINTER e LABRUNA, 2006), sendo *A. cajennense* o vetor mais comumente associado à doença (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935). A participação de *R. sanguineus* na epidemiologia de *R. rickettsii* no Brasil foi evidenciada pela primeira vez em uma área endêmica da região metropolitana de São Paulo (MORAES-FILHO *et al.*, 2009) mas o papel dessa espécie na transmissão de *R. rickettsii* já havia sido confirmado nos EUA (NICHOLSON *et al.*, 2006) e no México (BUSTAMANTE e VARELA, 1947), além de suspeitado na Colômbia (LABRUNA *et al.*, 2007b).

4.6 Controle e Prevenção das Doenças Transmitidas por Carrapatos

4.6.1 Controle de Vetores

A Prevenção de qualquer doença transmitida por carrapatos ainda é melhor conseguida através da remoção da possibilidade de exposição ao vetor (IRWIN, 2009). O controle de carrapatos deve ser feito simultaneamente no ambiente a fim de impedir reinfestações nos cães ou o acometimento em seres humanos, pois as formas de vida livre do parasito são capazes de sobreviver por longos períodos sem hospedeiros (FORTES *et al.*, 2011).

Quando pensarmos em controle de carrapatos devemos ter em mente que apenas 5% dos mesmos estão no cão, o restante (95%) está no ambiente. Então a eliminação efetiva da população de carrapatos irá exigir uma estratégia de controle integrada, tendo como alvo o cão e o ambiente no qual o mesmo é mantido. Uma estratégia de controle integrada significa que todas as tecnologias e técnicas de manejo serão utilizadas, proporcionando um efetivo declínio das populações do parasito de modo rentável. Essa abordagem inclui o uso de estratégias químicas e não-químicas (DANTAS-TORRES, 2008).

4.6.1.1 Estratégias químicas

Os cães podem ser tratados com uma gama diversificada de preparações veterinárias, tais como *pour on*, coleiras impregnadas, xampus, sprays e pós (GARRIS, 1991). Existem atualmente no mercado vários compostos que podem ser usados no controle químico de vetores (Amitraz, Piretróides, Fipronil, Imidaclopride), no entanto, estes fármacos não estão isentos de consequências e estão descritos múltiplos casos de desenvolvimento de resistências, devido ao seu uso indiscriminado e cálculo errado das quantidades a administrar (SEIXAS *et al.*, 2011).

Embora Oliveira *et al.* (2011) tenham relatado que o fipronil, um componente comercial bastante presente em bisnagas e coleiras para cães, é muito eficaz, o estudo não incluiu o impacto do acaricida nos cães. No entanto, o afoxolaner demonstrou alta eficiência contra carrapatos (*Ixodes*

scapularis) e nenhum efeito sobre beagles (MITCHELL *et al.*, 2014). Hunter *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes para fipronil, amitraz e (S)-metopreno sobre *R. sanguineus*, mas o estudo, como muitos outros, abrangeu um período de tempo curto. Além disso, como demonstrado por Reck *et al.* (2014) em *R. microplus*, o desenvolvimento de resistência a diversas novas substâncias químicas torna impossível determinar o tempo de ação eficaz para cada preparação química.

O uso de acaricidas em cães é geralmente eficaz para eliminar as infestações de carrapatos e para evitar reinfestações durante um certo período de tempo. A frequência do tratamento depende do grau de infestação e da duração do efeito residual do acaricida. Em qualquer caso, as orientações do fabricante devem ser sempre seguidas. Sempre que necessário, o veterinário pode adotar esquemas alternativos, embora cuidados devam ser tomados para evitar o uso inadequado de certos compostos ativos. O tempo exato necessário para o tratamento acaricida eliminar infestações severas é incerto. Exame físico regular dos cães tratados pode servir como um indicador do progresso (isto é, sucesso ou fracasso) do programa de controle (DANTAS-TORRES, 2008).

Como aproximadamente 95% dos carrapatos estão fora do hospedeiro, o uso de acaricidas no ambiente no qual o cão vive é sempre necessário. Esse tratamento pode ser efetivo apenas quando áreas restritas são tratadas. A eficácia irá depender de alguns fatores como: nível de infestação do ambiente, presença de infestação em áreas próximas à tratada, efeito residual do acaricida e condições do ambiente. Existem várias preocupações acerca do uso de acaricidas no ambiente. O uso impróprio desses produtos pode causar poluição ambiental e toxicidade aos humanos e a outros organismos não-alvo (a exemplo de predadores e parasitos dos carrapatos). Um manual de utilização segura de pesticidas e uma lista de acaricidas adequados para aplicação doméstica são disponibilizados pela OMS (World Health Organization, 2006; DANTAS-TORRES, 2008).

4.6.1.2 Estratégias não-químicas

O Médico Veterinário deverá ter um papel importante na educação dos proprietários não só para o uso racional dos parasiticidas, mas também na adoção de métodos não químicos para combater os vetores, a exemplo da manutenção da vegetação em corte baixo e do controle biológico (DANTAS-TORRES, 2008). Como os carrapatos possuem vários inimigos naturais (a exemplo de bactérias, fungos e nematódeos) o controle biológico dos mesmos parece ser viável (SAMISH *et al.*, 2004).

Fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* apresentaram potencial para o controle populacional de certas espécies de carrapatos incluindo *R. sanguineus* (SAMISH *et al.*, 2004; OSTFELD *et al.*, 2006). Outros candidatos para o biocontrole de carrapatos são as bactérias gram negativas simbióticas *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. transmitidas por dois importantes grupos de nematódeos isolados do solo: Steinernematidae e Heterorhabditidae (KREFT *et al.*, 2012).

A mudança no habitat é muito importante no controle de carrapatos *R. sanguineus*. Rachaduras e fendas devem ser seladas e a grama mantida em corte baixo. É importante notar que carrapatos *R. sanguineus* apresentam um comportamento endofílico marcante na maioria das regiões onde ocorrem. Nas casas altamente infestadas, os carrapatos são comumente visto subindo paredes, cortinas, janelas, portas e móveis. Nesses casos a dedetização do interior da casa pode ser necessária (DANTAS-TORRES, 2008).

4.6.2 Vacinas

Atualmente, não há produção de vacinas comerciais contra FMB, e a prevenção da doença em cães depende do controle da população de carrapatos, tendo em vista que quanto maior a população desses artrópodes, maior o risco de infecção (RAOULT e PAROLA, 2007), esse cenário se estende para erliquiose, anaplasmose e hepatozoonose.

Rudoler *et al.* (2012) avaliaram a utilização de uma amostra atenuada de *E. canis* (#611A) e obtiveram bons resultados no tocante ao desenvolvimento de uma vacina para EMC. Os resultados indicaram que a inoculação prévia dessa amostra reduziu a severidade dos sinais clínicos e a bacteremia nos cães infectados experimentalmente. Apesar disso, as questões acerca de reversão do estágio de atenuação para o de patogenicidade do inóculo não foram avaliadas, além da dose a ser administrada e das condições de infecção pelo carrapato.

As vacinas atuais contra babesiose são pouco eficazes, de elevado custo e gera-se dificuldade em distinguir indivíduos afetados dos vacinados. A pouca eficácia deve-se, em parte, à grande variabilidade antigênica destes agentes. Vacinas homólogas para *B. canis* não protegem contra outras espécies, o que levou ao desenvolvimento de vacinas heterólogas, mais eficazes (SEIXAS *et al.*, 2011; IRWIN *et al.*, 2009).

5. METODOLOGIA E RESULTADOS

Apresentados sob a forma de artigos:

ARTIGO 1 - An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano, Alzira Maria Paiva de Almeida, Elane Maria Camboim Lustosa, Aline Antas Cordeiro, Expedito Kennedy Alves Camboim, Sergio Santos de Azevedo, Paulo Paes de Andrade, Marcia Almeida de Melo. The Scientific World Journal. Article ID 605743, volume 2012. doi:10.1100/2012/605743, 1-6.

ARTIGO 2 – Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Paraíba State, Northeastern Brazil. T.E.F. Rotondano, H.K.A. Almeida, F.S.Krawczak, V.L.Santana, I.F. Vidal, M.B. Labruna, M.A. Melo, S.S. Azevedo, A.M.P. Almeida. Aceito para publicação no periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

ARTIGO 3 – Estudo de prevalência e fatores de risco de Erliquiose Monocítica Canina e outras rickettsioses em cães, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Tereza E. de F. Rotondano, Werona B. de Oliveira, Felipe da S. Krawzack, Jonas Moraes-Filho, Fernanda N. Bastos, Marcelo B. Labruna, Sérgio S. de Azevedo, Marcia A. de Melo, Alzira M.P. de Almeida. A ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

ARTIGO 1

Publicado no periódico The Scientific World Journal.

An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano, Alzira Maria Paiva de Almeida, Elane Maria Camboim Lustosa, Aline Antas Cordeiro, Expedito Kennedy Alves Camboim, Sergio Santos de Azevedo, Paulo Paes de Andrade, Marcia Almeida de Melo. The Scientific World Journal. Article ID 605743, volume 2012. doi:10.1100/2012/605743, 1-6.

Uma avaliação do sangue total e de suas frações como fonte de DNA para o diagnóstico de Erliquiose e Anaplasrose Caninas.

Nesse estudo procurou-se determinar a melhor fonte de DNA para a detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* por nested PCR (nPCR). A pesquisa envolveu amostras de sangue de 21 animais apresentando sintomatologia clínica e/ou resultados hematológicos sugestivos de erliquiose e/ou anaplasrose atendidos na rotina médica veterinária nos estados da Paraíba e Pernambuco localizados na região Nordeste do Brasil. Sangue total e diferentes frações (papa leucocitária, granulócitos, mononucleares e coágulo sanguíneo) foram submetidos à nPCR e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente juntamente com os dados hematológicos. O sangue total revelou-se como a melhor fonte de DNA para a detecção de *E. canis* e *A. platys* por nPCR. Neste trabalho foi evidenciada pela primeira vez, por técnica molecular, a infecção por *A. platys* em cão no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Research Article

An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis

Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano,¹ Alzira Maria Paiva de Almeida,²
Elane Maria Camboim Lustosa,³ Aline Antas Cordeiro,³
Exedito Kennedy Alves Camboim,³ Sérgio Santos de Azevedo,³
Paulo Paes de Andrade,⁴ and Marcia Almeida de Melo³

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenue Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Avenue Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

³Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, 58.700-970 Patos, PB, Brazil

⁴Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenue Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Marcia Almeida de Melo, marcia.melo@pq.cnpq.br

Received 23 June 2012; Accepted 12 July 2012

Academic Editors: B. Harrach and A. Reis

Copyright © 2012 Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ehrlichiosis and anaplasmosis are tick-borne diseases. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infect mainly white cells and platelets, respectively. The main DNA source for PCR is peripheral blood, but the potential of blood cell fractions has not been extensively investigated. This study aims at assessment of whole blood (WB) and blood fractions potential in nested PCR (nPCR) to diagnose canine ehrlichiosis and anaplasmosis. The 16S rRNA gene was amplified in 71.4, 17.8, 31.57, and 30% of the WB, granulocyte (G), mononuclear cells (M), and buffy coat (BC) samples. Compared to the WB, the sensitivity of the PCR was 42.86% for the M, and BC fractions, 21.43% for the G, and 33.33% for the blood clot (C). There was fair agreement between the WB and M, BC and C, and slight with the G. Fair agreement occurred between the nPCR and morulae in the blood smear. One animal was coinfecting with *A. platys* and *E. canis*. This study provided the first evidence of *A. platys* infection in dogs in Paraíba, Brazil, and demonstrated that WB is a better DNA source than blood fractions to detect *Ehrlichia* and *Anaplasma* by nPCR, probably because of the plasma bacterial concentration following host cell lysis.

1. Introduction

Ehrlichiosis and anaplasmosis are important, emerging zoonotic tick-borne diseases caused by gram-negative, obligate intracellular bacteria from the Anaplasmataceae family. In the host cells, the bacteria reside in inclusion bodies (morulae), which provide a hospitable environment for survival [1, 2].

Canidae can be infected by several Anaplasmataceae agents: *Ehrlichia canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys*, *A. phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, and *N.*

helminthoeca. *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections are transmitted through the salivary secretions of attached ticks. *Ehrlichia canis* is usually transmitted by brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) bites, which can also transmit *E. ewingii* and most likely *Anaplasma platys* [1]. The occurrence of the tick *R. sanguineus* parasitizing humans in Brazil [3] serves to warn the risk of transmission of such pathogens (*A. platys* and *E. canis*) to humans [4, 5].

E. canis species mainly infect monocytes, which causes canine monocytic ehrlichiosis, and *A. platys* species infect platelets, which causes canine cyclic thrombocytopenia.

The *A. platys* platelet tropism is unique among ehrlichial-related organisms, even though all of these infections may result in thrombocytopenia [2]. *E. canis* is the main pathogen implicated in cases of canine ehrlichiosis in Brazil, but *A. platys* has recently been identified by PCR in samples from the South region with a prevalence ranging from 25.5% to 55% [1, 5].

The diagnosis of canine ehrlichiosis and anaplasmosis relies on the cultivation, serology, PCR, and direct microscopic examination of stained blood smears to identify intracytoplasmic morulae. Smear diagnosis has low sensitivity, as there are few bacteria present in the samples, morulae can be visualized only during the acute phase, and the percentage of infected cells is usually less than 1% [6]. Additionally, the presence of *A. platys* is cyclical, and the bacteria are easily mistaken as nonspecific inclusion bodies and staining artifacts [1, 7]. Serology is hampered by cross-reactions and cannot discriminate between a current infection and previous exposure to the pathogen. Moreover, antibody titers tend to persist for several months to years after treatment, making serology an unreliable tool for posttreatment diagnosis [8].

The first PCR-based diagnostic method for ehrlichiosis amplified the 16S rRNA gene and was reported by Iqbal et al. in 1994 [9]. Further improvements and the use of other target genes increased the sensitivity of the tests. The p30-based nested PCR (nPCR) assay has been shown to be more sensitive than the 16S rRNA-based nPCR assay [10], possibly because *E. canis* contains multiple copies of the p30 gene but only one copy of the 16S rRNA gene [11]. As opposed to single-step PCR, nPCR amplification of the 16S rRNA gene has been used more often to detect *E. canis* and *A. platys*. In both single step PCR and nPCR, the peripheral blood is frequently used as a DNA source [1, 5, 12]. Only a single report has described the use of mononuclear cells as a DNA source [9].

There is a high prevalence of canine ehrlichiosis, but there are few reports on the identification of the infectious agents; therefore, a practical diagnostic technique that can be routinely used in veterinary medicine must be established. The nPCR assay may fulfill this requirement, but the blood fraction that serves as the best DNA source must be determined beforehand. The aim of the present study was to compare the effectiveness of whole blood (WB) and blood fractions—buffy coat (BC), granulocytes (G), mononuclear fraction (M) and blood clot (C)—by nPCR to diagnose canine ehrlichiosis and anaplasmosis.

2. Methods

2.1. Samples and Cell Fractionation. Blood was collected from 21 dogs bearing suggestive clinical signs of either ehrlichiosis or anaplasmosis (petechia, ecchymosis, fever, and anorexia) and harboring ticks. Some animals also had intracytoplasmic morulae, as indicated by direct examination of blood smears and/or hematological parameters suggestive of ehrlichiosis and anaplasmosis. The dogs were selected from the veterinary hospital Universidade Federal

de Campina Grande (UFCG), the Veterinary Medical Center Dr. Leonardo Torres at Patos, State of Paraíba, and at the Veterinary Hospital at Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), at Recife, State of Pernambuco.

2.2. Hematology, Direct Examination of Blood Smears and Cell Fractionation. Routine platelet counts, packed cell volume, and other hematology parameters were performed at the hospitals referred to above. The reference values were those described in Jain (1993) [15]. WB smears were stained with a hematoxylin-eosin-based rapid stain (Panótico rápido, Laborclin, Brazil) and observed by microscopy (100X objective, under immersion oil). The M- and G-enriched samples were obtained from 4 mL of WB with the SepCell kit (LGC Biotecnologia, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The BC fraction was collected from 1 mL blood that was centrifuged at 12,000 g for 10 min.

2.3. DNA Extraction. From each dog, a sample of blood was collected, and the DNA was extracted. Four milliliters of blood were extracted with sodium citrate and 1 mL without sodium citrate. The DNA samples from the WB (200 μ L), BC (50 μ L), M (50 μ L), G (100 μ L), and C (50 μ L) fractions were extracted with a commercial kit (Invisorb Spin Blood Midi kit; INVITEK), following the manufacturer's instructions. The DNA from 21 WB, 19 G and 19M, 20 BC, and 15 C samples was used in the nPCR to amplify the *E. canis* and *A. platys* 16S rRNA sequences.

2.4. Nested PCR (nPCR). The first round of PCR used 0.5 to 1.0 μ g of the genomic DNA, and the primers ECC and ECB were designed to amplify a 478 base-pair (bp) fragment of the *Ehrlichia* 16S rRNA [13]. The second round of PCR used a 1.0 μ L aliquot of the first reaction as a template and the EHCA sense/EHCA antisense [14] and EHPL sense/EHPL antisense (João Pessoa Araújo Jr.: pers. comm., 2010) primers, which were designed to amplify a 389 bp fragment for *E. canis* and 384 bp fragment for *A. platys*, respectively. Separate reactions were used to detect each species individually. The primers are described in Table 1. The primer design was confirmed with the software Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). The reaction mix contained 1X reaction buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), and 0.1% Triton X-100), 1.75 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1 μ M PCR primers, 0.625 U Taq DNA polymerase, and autoclaved ultrapure water to a final volume of 25 μ L. The thermocycle was as follows: 94°C for 10 minutes followed by 40 cycles at 94°C for 60 seconds, 60°C for 60 seconds, 72°C for 60 seconds, and a final step of 72°C for 4 minutes before holding at 4°C. Ultra-pure autoclaved water was used as negative control in each PCR batch. The genomic DNA from confirmed *E. canis* and *A. platys* cases was used as positive controls for the *E. canis* 16S rRNA and *A. platys* 16S rRNA genes, respectively. Ten microliters of the final products were electrophoresed at 90 volts for approximately 1 hour in 1.5% agarose gels containing ethidium bromide in Tris-Borate EDTA (TBE).

TABLE 1: The primer sequences for the 16S rRNA gene used to detect the *E. canis* and *A. platys* by the nPCR reactions.

Primer identification	Etiological agent	Primer sequences	Reference	Expected amplified segment length	From-to (bp)
ECC	<i>E. spp.</i>	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	Dawson et al. [13]	478 bp	13–490
ECB	<i>E. spp.</i>	CGTATTACCGCGGCTGCTGGC			
EHCA sense	<i>E. canis</i>	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGC	Wen et al. [14]	389 bp	58–446
EHCA antisense	<i>E. canis</i>	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT			
EHPL sense	<i>A. platys</i>	TTTTTGTCTAGCTTGCTATGATA	João Pessoa Araújo Jr., pers. comm	384 bp	49–432
EHPL antisense	<i>A. platys</i>	TGTGGGTACCGTCATTATCTTCCCCA			

The *E. canis* and *A. platys* reactions were positive when a 389 or a 384 bp fragment was detected, respectively.

2.5. Statistical Analysis. The kappa and related indices were calculated by Dag Stat software [16] to determine the agreement between the results for the WB (gold standard) and blood fractions. The McNemar test was used to evaluate the concordance among DNA sources, and the Fisher's exact test was used to determine the association between thrombocytopenia, anemia, and a positive WB nPCR. The significance level was 5% for all of the analyses.

2.6. Ethical Considerations. The animals were used according to the guidelines of Oswaldo Cruz Foundation from Brazil's Ministry of Health.

3. Results

Table 2 shows the results of hematological, blood smear (direct examination), and nPCR on the WB, G, M, BC, and C samples from 21 dogs exhibiting clinical signs of ehrlichiosis. From each group, negative samples were detected. In seven animals (46.6%), identification at species level failed, as there was no amplification in the second PCR. Among them, the blood smears of five dogs were positive by direct examination and two displayed cytoplasmic inclusions.

Seven dogs (33.3%) were positive by nPCR and direct examination of blood smears (presence of morulae); inclusions within platelets were found in two blood smears. Out of the 14 blood smear-negative animals, eight (63.6%) had at least one blood fraction positive for *Ehrlichia* or *Anaplasma* by nPCR, corresponding to 57.1% false negatives by direct examination. The WB DNA samples from 66.6% (6/9) thrombocytopenic and 42.85% (3/7) anemic animals were positive by nPCR.

Among 21 WB samples, 26.6% (6/21) were negative by nPCR, and 71.4% (15/21) were positive: 46.4% (7/15) for *E. canis* (Figure 1) and 6.6% (1/15) for *A. platys*. *E. canis* was identified in G samples from 1.8% (3/19), in M samples from 31.6% (6/19), and in BC samples from 31.6% (6/19) animals. One BC sample was coinfecting with *E. canis* and *A. platys*. Among the C samples, 7.14% (1/14) were positive for *E. canis* and 14.3% (2/14) for *A. platys*.

Among the nPCR assays carried out in all samples (WB, G, M, BC, and C) from 11 animals, at least 63.3% (7/11) were

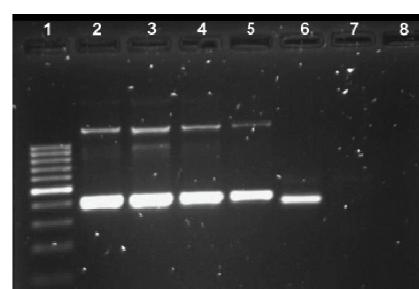


FIGURE 1: Detection of *Ehrlichia canis* in nPCR with EHCA sense and antisense primers for rRNA 16S gene. Lane 1: 100 base pair (bp) DNA ladder; lanes from 2 to 5: nPCR with DNA from WB; lane 6: *E. canis*-positive control and DNA from WB; lane 7: negative control; lane 8: nPCR-negative control.

positive; WB and C samples were simultaneously positive in 9% (1/11) and WB, M, and BC in 18.1% (2/11).

The nPCR sensitivity was 42.86% when the WB was compared to the M and BC fractions (McNemar test: $X^2 = 6.13$; $P = 0.013$), 21.43% compared to the G fraction (McNemar test: $X^2 = 9.09$; $P = 0.003$), and 33.33% compared to the C fraction (McNemar test: $X^2 = 4.17$; $P = 0.041$). The kappa value showed fair agreement among WB and M (Kappa = 0.28), BC (Kappa = 0.31), and C fractions (Kappa = 0.26) and slight agreement with G fraction (Kappa = 0.13). There was also fair agreement between the presence of morulae and the nPCR results (Kappa = 0.33; McNemar test: $X^2 = 6.13$; $P = 0.0133$).

4. Discussion

The direct examination of stained blood smears to detect *Ehrlichia* in dogs has a low sensitivity rate (3 to 9%). In fact, *E. canis* morulae are difficult to detect in blood smears because this organism is usually present in very low concentrations [6]. In contrast, PCR has proven to be more sensitive for detecting *Ehrlichia*; for a 16S rRNA-based PCR assay is able to detect *E. canis* DNA from a rickettsemia, which is equivalent to one infected monocyte in 10^{36} cells [1, 5, 12]. In addition to the large sensitivity differences inherent to the techniques, genotypic variants have been reported for *E. ruminantium*, and *A. platys* infects a wide range of host cells [1, 2, 17].

TABLE 2: Hematological, blood smear direct examination and whole blood (WB), granulocytes (G), peripheral blood mononuclear cells (M), buffy coat (BC) and blood clot (C) PCR results of dogs with clinical signs of ehrlichiosis.

Animal ID	Packed cell volume**	Leukocytes***	Platelets****	Blood smear	WB	G	PCR M	BC	C
01	37	18,100	314,000	Positive	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	*
02	45	6,200	49,000	Negative	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	*
03	51	8,000	195,000	Negative	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	Negative
04	*	*	*	Negative	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	*
05	27	35,300	334,000	Negative	Negative	*	*	Negative	Negative
06	46	8,200	257,000	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	*
07	51	6,200	199,000	Negative	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	*
08	37	9,700	248,000	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
09	51	20,250	595,000	Positive	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	*
10	*	*	*	Negative	<i>E. canis</i>	Negative	<i>E. canis</i>	*	<i>E. canis</i>
11	16	65,100	67,000	Negative	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	*
12	*	*	*	Positive	<i>E. canis</i>	*	*	<i>E. canis/A. platys</i>	<i>A. platys</i>
13	*	*	*	Positive	<i>E. canis</i>	Negative	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	Negative
14	41	*	119,000	Negative	<i>A. platys</i>	Negative	Negative	Negative	<i>A. platys</i>
15	21	12,900	116,000	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
16	27	14,800	148,000	Positive	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	Negative
17	35	10,000	*	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
18	31	—	44,400	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
19	31	27,100	408,000	Positive	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	Negative
20	41	13,100	277,920	Positive	<i>Ehrlichia</i> spp.	Negative	Negative	Negative	Negative
21	42	21,900	21,900	Negative	<i>E. canis</i>	Negative	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>	Negative

ID: Identification; RV: reference value (Jain, [15]); * not performed; ** Packed cell volume (RV: 37–55%); *** Leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$); **** Platelets ($\times 10^5/\mu\text{L}$); RV: 6–17; **** Platelets ($\times 10^5/\mu\text{L}$); RV: 2–5).

As expected, our study demonstrates that nPCR is more sensitive for detecting *Ehrlichia* than the direct examination of stained blood smears of dogs with suggestive clinical signs. Our results show that a 50% false negative rate may occur when only direct examination is used for diagnosis. In contrast, all animals with morulae in the blood smears were positive by nPCR for at least one of the WB or fraction samples.

The nPCR was able to detect *Ehrlichia* or *Anaplasma* DNA in 71% of the samples from dogs with suggestive clinical signs. This rate is slightly higher than that registered elsewhere in Brazil [1, 5, 12]. As previously reported [1, 5], *E. canis* (46.6%) positivity in WB was higher than for *A. platys* (6.6%).

In seven (46.6%) of the samples, there was no amplification in the second PCR, and the positives were recorded as *Ehrlichia* spp. As the primers used were specific for *E. canis* and *A. platys*, the presence of other Rickettsiales, such as *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii*, should not be disregarded because they can also form cytoplasmic inclusions [18, 19]. Furthermore *E. ewingii* was already reported in dogs in Brazil [20].

Coinfection with *E. canis* and *A. platys* was observed in an animal with a positive blood smear and that was positive for *E. canis* in the WB sample by nPCR. Cytoplasmic inclusions in the platelets were not observed, possibly due to low *A. platys* load [7]. It is worth mentioning that this is the first evidence for the involvement of *A. platys* in canine anaplasmosis in the State of Paraíba, Brazil.

The blood fraction samples that were positive for *A. platys* by nPCR were WB and C (dog no. 14) and B and C (dog no. 12). Despite the small sample size, the results suggest an increased likelihood of finding *A. platys* DNA in the BC fraction, which is more enriched with platelets than the other samples.

Contrary to previous reports [21, 22], we found that there was no statistical association between thrombocytopenia ($P = 0.596$), anemia ($P = 0.299$), and the WB nPCR results. Similar to a previous report [1], anemia occurred in only 26.6% cases. These results demonstrate that thrombocytopenia is not sufficient to diagnose either canine ehrlichiosis or anaplasmosis. Santos et al. [22] also observed a high incidence of *E. canis* infection among nonthrombocytopenic dogs. In contrast, other diseases including immune-mediated thrombocytopenia, neoplasia, inflammatory diseases, or other infectious agents can provoke thrombocytopenia [23]. The differences in prevalence may reflect the diversity in strain pathogenicity or a selection bias because thrombocytopenic dogs are more likely to be tested for ehrlichiosis.

Peripheral blood has been the main source of *Ehrlichia* DNA for PCR assays because collection of this sample is less invasive than spleen and bone marrow collection. The use of serum samples for nPCR to detect *E. canis* has been suggested previously [24]. Our results support that whole blood is the best source for *Ehrlichia* DNA in PCR assays. Indeed, the Kappa value indicates a weak correlation between nPCR results from the WB samples and those obtained with the G, M, BC, or C samples; the PCR sensitivity from the M

and B samples was only 42.9%. Therefore, our data and the literature support the use of WB as the best choice for DNA source for PCR *Ehrlichia* spp. detection.

This is the first assessment of the use of different blood cell fractions as DNA sources to diagnose canine ehrlichiosis and anaplasmosis by PCR. Although the pathogens only infect leukocytes and platelets, WB is a better DNA source than any of the cellular *Ehrlichia*-enriched host cell fractions. A possible explanation may be based on the assumption that WB samples contain not only intracellular *Ehrlichia* but also organisms released by host cell lysis that are not found in the fractions. In support of this hypothesis, the 16S rRNA gene was successfully amplified by Mylonakis et al. [25] by nPCR in sera samples from naturally infected dogs. Hence, these authors recommend serum-based PCR analysis for the early diagnosis of CME when WB samples are not available. Furthermore, it was demonstrated that *E. chaffeensis* reached concentrations of $\sim 10^8$ bacteria/mL in the plasma of SCID mice two weeks after infection [26]. There are no similar studies for *E. canis* or *A. platys*, but it is reasonable to assume that a similar scenario occurs in dogs infected with these pathogens, especially in the acute phase of the disease, when symptoms are severe, and platelet counts are usually reduced.

In conclusion, the present study demonstrates that canine WB is better than other cellular blood fractions as a DNA source to detect *Ehrlichia* and *Anaplasma* by PCR, most likely because of the bacterial concentration in the plasma following host cell lysis.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) and by the State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE). It was Financially supported by the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE). T. E. F. Rotondano was a FACEPE fellow during the development of this study. The authors thank the Laboratório de Diagnóstico Molecular (UNESP), Botucatu, SP, Brazil for testing the samples.

References

- [1] A. S. Dagnone, A. I. Souza, M. R. André, and R. Z. Machado, "Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis," *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 18, no. 4, pp. 20–25, 2009.
- [2] L. A. Cohn, "Ehrlichiosis and related infections," *Veterinary Clinics of North America*, vol. 33, no. 4, pp. 863–884, 2003.
- [3] F. Dantas-Torres, L. A. Figueredo, and S. P. Brandão-Filho, "*Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 39, no. 1, pp. 64–67, 2006.

- [4] L. T. M. Figueiredo, S. J. Badra, L. E. Pereira, and M. P. J. Szabó, "Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 32, no. 6, pp. 613–619, 1999.
- [5] C. A. N. Ramos, R. A. N. Ramos, F. R. Araújo, D. S. Guedes Jr., and I. I. F. Souza, "Ono TM. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães," *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, vol. 18, pp. 58–62, 2009.
- [6] H. F. Cadman, P. J. Kelly, L. A. Matthewman, R. Zhou, and P. R. Mason, "Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*," *Veterinary Record*, vol. 135, no. 15, p. 362, 1994.
- [7] C. Arraga-Alvarado, M. Palmar, O. Parra, and P. Salas, "*Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections," *Veterinary Pathology*, vol. 40, no. 2, pp. 149–156, 2003.
- [8] T. Waner, S. Harrus, F. Jongejan, H. Bark, A. Keysary, and A. W. C. A. Cornelissen, "Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*," *Veterinary Parasitology*, vol. 95, no. 1, pp. 1–15, 2001.
- [9] Z. Iqbal, W. Chaichanasiriwithaya, and Y. Rikihisa, "Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, no. 7, pp. 1658–1662, 1994.
- [10] R. W. Stich, Y. Rikihisa, S. A. Ewing, G. R. Needham, D. L. Grover, and S. Jittapalpong, "Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 2, pp. 540–546, 2002.
- [11] S. Harrus and T. Waner, "Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview," *Veterinary Journal*, vol. 187, no. 3, pp. 292–296, 2011.
- [12] A. C. H. Nakaghi, R. Z. Machado, M. R. André, C. D. Baldani, and M. T. Costa, "Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects," *Ciencia Rural*, vol. 38, no. 3, pp. 766–770, 2008.
- [13] J. E. Dawson, D. E. Stallknecht, E. W. Howerth et al., "Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, no. 11, pp. 2725–2728, 1994.
- [14] B. Wen, Y. Rikihisa, J. M. Mott et al., "Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 7, pp. 1852–1855, 1997.
- [15] N. C. Jain, *Essentials of Veterinary Hematology*, Lea & Febiger, Philadelphia, Pa, USA, 1993.
- [16] A. Mackinnon, "A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement," *Computers in Biology and Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 127–134, 2000.
- [17] M. T. E. P. Allsopp and B. A. Allsopp, "Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 11, pp. 4204–4207, 2001.
- [18] R. F. Ferreira, A. M. F. Cerqueira, A. M. Pereira et al., "*Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests," *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, vol. 5, pp. 113–119, 2007.
- [19] Y. Rikihisa, "Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses, and humans," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 14, no. 3, pp. 250–251, 2000.
- [20] L. S. Oliveira, K. A. Oliveira, L. C. Mourão et al., "First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 15, no. 2, pp. 55–56, 2009.
- [21] C. Bulla, R. K. Takahira, J. P. Araújo Jr., L. A. Trinca, R. S. Lopes, and C. E. Wiedmeyer, "The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area," *Veterinary Research*, vol. 35, no. 1, pp. 141–146, 2004.
- [22] F. Santos, J. S. Coppede, A. L. A. Pereira et al., "Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil," *Veterinary Journal*, vol. 179, no. 1, pp. 145–148, 2009.
- [23] C. B. Grindem, E. B. Breitschwerdt, W. T. Corbett, and H. E. Jans, "Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases," *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 20, pp. 38–43, 2002.
- [24] M. E. Mylonakis, V. I. Siarkou, L. Leontides, E. Bourtz-Hatzopoulou, V. I. Kontos, and A. F. Koutinas, "Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis," *Veterinary Microbiology*, vol. 138, no. 3-4, pp. 390–393, 2009.
- [25] M. E. Mylonakis, A. F. Koutinas, C. Billinis et al., "Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods," *Veterinary Microbiology*, vol. 91, no. 2-3, pp. 197–204, 2003.
- [26] J. S. Li and G. M. Winslow, "Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 8, pp. 4229–4237, 2003.

ARTIGO 2

Aceito para publicação no periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Paraíba State, Northeastern Brazil. T.E.F. Rotondano, H.K.A. Almeida, F.S. Krawczak, V.L. Santana, I.F. Vidal, M.B. Labruna, M.A. Melo, S.S. Azevedo, A.M.P. Almeida. Investigação da ocorrência de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães do município de Patos, na região semiárida do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Neste trabalho foi investigada a ocorrência de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães oriundos da rotina médica veterinária, apresentando infestação por carrapatos, no município de Patos, região semiárida do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Amostras de sangue foram colhidas de 100 animais e um questionário epidemiológico foi aplicado para obtenção de informações sobre os cães e seus proprietários. As amostras de sangue foram submetidas à avaliação hematológica com pesquisa de hemoparasitos e testadas, por meio de PCR convencional e em tempo real (qPCR) para amplificação de DNA específico de *E. canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. Os resultados foram avaliados por programa estatístico. Em conclusão, a presença de *Hepatozoon* spp. não foi detectada entre os animais estudados; o estudo revelou que *E. canis* é o patógeno, transmitido por carrapato, de maior prevalência na região; animais positivos para *B. canis vogeli* foram detectados sendo esse o primeiro relato desse agente infectando cães no estado da Paraíba Nordeste do Brasil.

Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Paraíba State, Northeastern Brazil

Pesquisa de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães da região semiárida do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano^{1*}, Herta Karyanne Araújo Almeida², Felipe da Silva Krawczak³, Vanessa Lira Santana², Ivana Fernandes Vidal², Marcelo Bahia Labruna³, Sérgio Santos de Azevedo², Alzira Maria Paiva de Almeida⁴, Marcia Almeida de Melo²

¹ Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, PE, Brasil

² Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Patos, PB, Brasil

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Recife, PE, Brasil

Abstract

This study assessed the occurrence of *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. infections in 100 tick-harboring dogs from a semiarid region of the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Blood samples and ticks were collected from the animals, and a questionnaire was submitted to dog owners to obtain general data. Blood samples were used to perform hemogram, direct blood smear and immunological and molecular hemoparasite detection. The 1,151 ticks collected were identified as *Rhipicephalus*

* **Corresponding author:** Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-901 Recife, PE, Brasil (5583)88589588.

email: terezarotondano@hotmail.com

sanguineus; direct smears revealed *E. canis*-like morulae in the monocytes of 4% (4/100) of the non-vaccinated female dogs, and 34% and 25% of the dogs tested positive for *Ehrlichia canis* by indirect immunofluorescence assay (IFA) and polymerase chain reaction (PCR), respectively. Blood smear examination revealed *Babesia*-suggestive inclusions in the erythrocytes of 2% (2/100) of the animals. *Babesia vogeli* was detected by PCR in ten animals (10%) and was correlated with young age ($p = 0.007$) and thrombocytopenia ($p = 0.01$). None of the animals showed *Hepatozoon* spp. positivity. These results indicate that *E. canis* is the main tick-borne canine pathogen in the study area and provide the first report of *B. vogeli* infection in dogs from Paraíba State.

Key-words: *Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, dogs, Northeastern Brazil.

Introduction

Tick-borne diseases are important cause of morbidity and mortality in dogs worldwide, and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* has been implicated as vector of several pathogens (DANTAS-TORRES, 2008). In Brazil, the main tick-borne pathogens that have been described for dogs are *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*, and *Mycoplasma haemocanis* (RAMOS et al., 2010; SANTOS et al., 2009; SPOLIDORIO et al., 2009, 2011).

E. canis is the primary etiologic agent of canine monocytic ehrlichiosis (CME), which is a multisystemic disease manifesting in acute, subclinical or chronic forms, according to the virulence level of the *E. canis* strain and the presence of co-infection with other arthropod-borne pathogens, such as *Babesia* spp. and *H. canis* (GAL et al., 2007).

Babesiosis is an emerging tick-borne disease affecting animals and humans, caused by intraerythrocytic protozoa of the genus *Babesia* (IRWIN, 2009). In Brazil, two *Babesia* species infecting dogs have been reported, *B. vogeli* (PASSOS et al., 2005) and *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006). *B. vogeli* is the most widespread canine piroplasm due to the cosmopolitan nature of its invertebrate host, the brown dog tick *R. sanguineus*. All *Babesia* species may cause pyrexia, anorexia, splenomegaly, anemia and severe thrombocytopenia (IRWIN, 2009).

The *Hepatozoon* species known to infect dogs are protozoans transmitted through the ingestion of infected ticks (SPOLIDORIO et al., 2009, 2011). Veterinarians

usually misdiagnose the infection because the general symptoms are similar to those of other tick-borne diseases, such as ehrlichiosis and babesiosis (MURATA et al., 1991). Two *Hepatozoon* species have been described in dogs, including *H. canis* and *H. americanum* (BANETH et al., 2000, 2007), the former is responsible for all Brazilian cases reported in domestic dogs (SPOLIDORIO et al., 2011).

This study aimed to assess the occurrences of *E. canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. infections in dogs from the semiarid region of the State of Paraíba, Northeastern Brazil, using direct examination, serology and molecular detection methods and to identify factors associated with these infections.

Materials and methods

Study area and dog sampling

This study was carried out in the municipality of Patos (7°1'S, 37°19'W) located in the State of Paraíba in the semiarid region of Northeastern Brazil. This locality has an average temperature of 32°C, relative humidity of 55% and annual rainfall of 700 mm. One hundred tick-harboring dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande from April to September of 2012 were selected for this study. A questionnaire was submitted to dog owners to obtain general information, such as the education and income of the owner (minimum wage), the sex and age of the dog, breed, management, food intake, vaccination and deworming statuses, contact with other animals (other dogs, cats, horses, pigs, and wild animals), the condition of the floor of the dog's premises, the cleaning of the dog's premises, and the frequency of cleaning.

Tick collection and identification

Ticks were randomly collected from the animals during a five-minute examination of each animal, and they were then submerged into 70% ethyl alcohol in polypropylene tubes and stored at room temperature until identification. Tick taxonomic identifications were performed according to Barros-Battesti et al. (2006).

Blood sample collection

Blood samples were collected by cephalic or jugular venipuncture into Vacutainer tubes containing sodium citrate. Direct examinations of the hemogram and

smear were carried out immediately after blood collection. Reference values (RV) according to Jain (1993) were as follows: leukocytes (RV: $6-17 \times 10^3/\mu\text{l}$), erythrocytes (RV: $5.5-8.5 \times 10^6/\mu\text{l}$), and platelets (RV: $2-5 \times 10^5/\mu\text{l}$). Aliquots of plasma and whole blood were stored at -20°C for subsequent use.

Indirect immunofluorescence assay (IFA)

The presence of anti-*E. canis* antibodies in the plasma was assessed by an Indirect immunofluorescence assay IFA using glass slides coated with crude antigens of *E. canis* (São Paulo strain) as previously described (AGUIAR et al., 2007). Plasma samples were initially tested at a screening dilution (1:80) (KRAWCZAK et al., 2012) and then re-tested with serial two-fold dilutions of up to 1:1280. A commercial fluorescein-labeled rabbit anti-canine IgG (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce St. Louis, MO 63103, USA) was used as the secondary antibody.

Molecular analyses

Total DNA was extracted from canine whole blood using a commercial DNA extraction kit (Wizard Kit for DNA Extraction[®]) according to the manufacturer's instructions (Promega) and eluted in 50 μL of the elution buffer accompanying the extraction kit.

Assays to detect *E. canis* DNA were performed using a TaqMan real-time PCR (qPCR) system targeting a portion of the *Ehrlichia* disulfide bond formation protein-encoding gene (*dsb*) with the primers dsb-321 (5'-TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA-3') and dsb-671 (5'-GCTGCTCAACCAAGAAATGTATCCCCTA-3') and the *E. canis*-specific probe (5'-FAM AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-BHQ-1-3') at a concentration of 25 $\mu\text{mol/L}$ as previously described (DOYLE et al., 2005). Positive (DNA from *E. canis*-cultured DH82 cells) and negative (DH82 cells only) controls were included for all PCR assays. Samples with negative results, as shown by the *E. canis*-specific qPCR, were evaluated using conventional PCR with the primers dsb-330 (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') and dsb-728 (5'-CTGCTCGTCTATTTACTTCTTAAAGT-3'), which were designed to amplify a 409-base pair (bp) fragment of the *dsb* gene of *Ehrlichia* spp. (LABRUNA et al., 2007).

For the detection of *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. DNA, five μ L of extracted DNA were used for conventional PCR with the primers HEP144-169 (5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3') and HEP743-718 (5'-ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG-3'), which amplify a 574-bp fragment of the 18S rRNA gene of *Hepatozoon* spp., and the primers BAB143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') and BAB694-667(5'-GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG-3'), which amplify a 551-bp fragment of the 18S rRNA gene of *Babesia* spp., as previously described (ALMEIDA et al., 2012).

PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel (Invitrogen, Carlsbad, CA), stained with ethidium bromide (AMRESCO, Solon, OH), and examined under UV illumination. Amplicons of the expected sizes were purified with ExoSap (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) and sequenced with an automatic sequencer (Applied Biosystems, model ABI 3500 Genetic Analyzer) according to the manufacturer's protocol. The partial sequences obtained were subjected to BLAST analysis (ALTSCHUL et al., 1990) to determine the presence of any similarities to corresponding sequences.

Statistical analysis

Risk factor analyses were performed considering the serological or molecular detection of *E. canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. as the dependent variables and the data obtained from the questionnaire and hemogram as independent variables. The association between the dependent and independent variables was assessed in 2 steps with univariate and multivariable analyses. The variables presenting $P \leq 0.20$ as determined by the chi-square test in the univariate analysis were selected and subjected to multivariate analysis using the logistic regression stepwise forward method with a 5% significance level (HOSMER; LEMESHOW, 1989). The serological results were analyzed using the following dichotomic variables: (i) dogs serologically negative or with a titer <80 (0), and (ii) dogs with a titer ≥ 80 (1) for *E. canis*. The kappa index (THURSFIELD, 2007) was used to compare the IFA with the PCR and direct blood smear results for *E. canis*. Mean tick infestations among dogs positive and negative for *E. canis* or *Babesi* spp. were compared by the *t*-Student test. All analyses were performed with SPSS 13.0 for Windows.

Ethical considerations

The present study was submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Campina Grande, protocol number 07/2012, prior to initiation.

Results

Hemogram analysis revealed that 52% (52/100) of the dogs were anemic, 12% (12/100) were leukopenic, and 37% (37/100) exhibited decreased platelets. Direct blood smear examination revealed *E. canis*-like morulae within the monocytes of 4% (4/100) of the dogs and *Babesia*-suggestive inclusions in the erythrocytes of 2% (2/100) of the animals.

E. canis antibodies were detected in 34% (34/100) of the tested dogs, with titers ranging from 80 to ≥ 1280 . Among the 100 tested dogs, 9, 6, 6, 3, and 10 had endpoint titers of 80, 160, 320, 640, and ≥ 1280 , respectively. *E. canis* DNA was detected by qPCR in 25% (25/100) of the dogs. None of the qPCR-negative samples were positive according to the *Ehrlichia* genus-specific PCR, indicating the exclusive occurrence of *E. canis* in the studied population.

From the 100 canine samples examined, 10 yielded PCR amplicons for *Babesia* spp., which were confirmed by DNA sequencing. By BLAST analysis, the sequences obtained from the *Babesia*-specific PCR were shown to be 100% identical to available sequences from *B. vogeli* (JF825145.1, AY371196.1, EF052627.1, AY371195.1, and DQ297390.1). A partial sequence (18S rRNA) generated from one of the dogs was deposited into GenBank under the accession number KJ494656. None of the canine blood samples yielded amplicons in the *Hepatozoon*-specific PCR.

Age was revealed to be a risk factor for babesiosis ($p = 0.007$; odds ratio [OR] = 0.197; confidence interval [CI] 95% = 0.061-0.640; standard error [SE] = 0.601), with a higher frequency observed in the younger dogs (6-12 months, table 1). A significant correlation was found between decreased platelets and *B. vogeli* occurrence ($p = 0.01$). Based on the serological results, the act of not vaccinating dogs was associated with an increased risk of ehrlichiosis ($p = 0.007$; OR = 3.921; 95% CI = 1.462–10.512; SE = 0.503). Based on the qPCR results, the females were 2,705 more likely to develop ehrlichiosis than the males ($p = 0.041$; 95% CI = 1.040-7.036; SE = 0.488).

The kappa index revealed fair agreement between the qPCR and IFA results in terms of *E. canis* diagnosis ($p = 0.0037$), i.e., 55% (55/100) of the dogs were negative according to qPCR and IFA, and 14% were positive according to both tests. The kappa value for both tests was 0.2619. Poor agreement was observed between the IFA and PCR ($k = 0.03$) and between the IFA and blood smears ($k = 0.0741$). The hematological disorders of anemia, leukopenia and thrombocytopenia showed statistically significant associations ($p \leq 0.05$) with the qPCR results for *E. canis*.

From the 100 tick-harboring dogs, 1,151 ticks were collected, giving an overall mean infestation of 11.5 ticks/dog (range 1–34). Mean tick infestations were statistically similar ($P > 0.05$) among positive and negative dogs for *E. canis* or *B. vogeli*, with mean values of 10.2 and 12.2 ticks/dog for *E. canis* serologically positive and negative dogs, respectively; 10.0 and 12.0 ticks/dog for *E. canis*-PCR positive and negative dogs, respectively; and 14.6 and 11.2 ticks/dog for *B. canis*-PCR positive and negative dogs, respectively.

Discussion

R. sanguineus was the only tick species found on the dogs evaluated in this study. According to Tanikawa et al. (2012), the warm weather that occurs in the city of Patos, Paraíba State, which is located in the semiarid region of Northeastern Brazil, is an important factor contributing to the dissemination of this tick species, while at the same time precluding the establishment of many other tick species, which usually require higher moisture during their off-host developmental stages. *R. sanguineus* ticks are considered less dependent for survival upon moisture-rich habitats, allowing for their establishment in regions with unfavorable water balances (YODER et al., 2006). This characteristic contributes to the establishment of these ticks in semi-arid regions, such as that of the present study.

IFA antibody titers for *E. canis* ranging from 80 to ≥ 1280 were found in 34% of the animals. A similar seroprevalence has been previously observed by Carlos et al. (2007) and Souza et al. (2010) in Northeastern Brazil. These high titers are consistent with prolonged infection and chronic antigenic stimulation (BARTSCH; GREENE, 1996).

E. canis DNA was detected by qPCR in 25% of the dogs. This prevalence is higher than those previously observed by Carvalho et al. (2008) and Tanikawa et al.

(2012). The high sensitivity of qPCR (DOYLE et al., 2005; HARRUS; WANER, 2011) may explain this difference in comparing the present results with previous results based on conventional PCR. Furthermore, the selection of tick-harboring dogs may have contributed to the higher *E. canis* detection in our study.

According to Solano-Gallego et al. (2006), epidemiological factors related to climatic conditions, vector distribution, population, animal behavior and habitat as well as the investigation methods used can affect the calculation of the prevalence of canine ehrlichiosis in Brazil. None of samples that were negative according to qPCR were positive according to the *Ehrlichia* genus-specific PCR, indicating the sole existence of *E. canis* in the studied population. At least four *Ehrlichia* species have been reported in Brazil, *E. canis*, infecting mainly dogs (VIEIRA et al., 2011), *E. ewingii* infecting dogs (OLIVEIRA et al., 2009), *E. chaffeensis* infecting deer (MACHADO et al., 2006), and *E. mineirensis* infecting cattle (CRUZ et al., 2012; AGUIAR et al., 2014); however, only *E. canis* has been reported in the Northeast region (SOUZA et al., 2010, VIEIRA et al., 2011), which is likely related to the higher occurrence of the tick *R. sanguineus* in this region.

In 20% (20/100) of the samples, *E. canis* antibodies were detected by the IFA test in the absence of DNA amplification by qPCR. The IFA test as an additional serological method can generate false-positive results; furthermore, it does not differentiate active infection from previous exposure to an organism (VIEIRA et al., 2011). In addition, anti-*E. canis* antibodies can persist and be detected after healing. On the other hand, the ability of conventional PCR to detect *Ehrlichia* DNA in seropositive dogs depends on the sample source and target gene (HARRUS et al., 2004). The ability of qPCR to detect ehrlichial DNA, indicating active infection, rather than detecting an anti-*E. canis* antibody, which is suggestive of exposure, constitutes an advantage that allows for clinicians to better monitor treatment progress (HARRUS; WANER, 2011).

These results demonstrate that CME is endemic in the city of Patos, suggesting either previous exposure to the agent or the presence of active infection. Hence, this disease must be included as a part of the differential diagnosis in routine veterinary care in this locality and considered as a public health issue. Some *E. canis* strains are capable of infecting humans (PEREZ et al., 2006) and although it is unusual, the parasitism of humans by *R. sanguineus* has been described (DANTAS-TORRES, et al., 2006).

Out of the samples analyzed for *E. canis*, 55% (55/100) were qPCR and IFA negative, and 14% were positive by both tests. The kappa value ($k = 0.2619$) showed fair agreement between these two tests, with a significant p-value ($p = 0.0037$), indicating the lack of a significant difference between the two techniques. Poor agreement was observed between the IFA and PCR and blood smear tests ($k = 0.03$ and $k = 0.0741$, respectively). This can be attributed to the poor sensitivity of the cytology test, which was successful in only 4% of the cases and has been shown to be more sensitive during the acute phase of infection (WOODY; HOSKINS, 1991). Furthermore, false positives can occur if morulae are misidentified as platelets, lymphocytic azurophilic granules or nuclear phagocytosed material (BREITSCHWERDT et al., 1998).

Based on the serological results, the non-vaccination of dogs was considered a risk factor for ehrlichiosis (table 2). Although commercial canine vaccines for different bacterial and viral diseases do not specifically protect dogs against *E. canis*, in general, immunization against the main dog diseases promotes good health and prevents the immune decline that increases vulnerability to ehrlichiosis. Furthermore, the simple act of vaccinating is reflective of a careful owner who is attentive to their dog's well-being, likely resulting in the less frequent exposure of the animal to ticks, and consequently, to ehrlichial infection.

The qPCR results revealed that the females were 2.705 more likely to develop the disease than the males ($p = 0.041$). No correlation has been found between the gender of the dog and disease occurrence by Carvalho et al. (2008) and Santos et al. (2013). The processes of estrus and parturition that occur in females lead to immune system depression. This could explain the vulnerability of this gender to ehrlichiosis.

The hematological disorders of anemia, leukopenia and thrombocytopenia showed statistically significant associations ($p \leq 0.05$) to *E. canis*-positive qPCR results. Bulla et al. (2004) and Dagnone et al. (2003) have recommended that ehrlichiosis should be included in the differential diagnosis of anemic and thrombocytopenic dogs. Santos et al. (2009) have observed a high prevalence of *E. canis* in non-thrombocytopenic dogs and have recommended the addition of hematologic evaluation as a complementary diagnostic test for the definitive diagnosis of ehrlichiosis and the avoidance of unnecessary antibiotic use.

Out of the 100 canine samples examined, 10 yielded PCR amplicons for *Babesia* spp., which were confirmed as *B. vogeli* by DNA sequencing. This is the first report of *B. vogeli* in dogs from Paraíba State, and the frequency of positive animals obtained (10%, 10/100) is higher than that reported by Ramos et al. (2010) in another area of Northeastern Brazil. This higher frequency could be related to the fact that all sampled dogs were from areas where they had probably been exposed to *R. sanguineus*, since all of them were infested by this tick species when they were sampled for this study.

Age was considered a risk factor for babesiosis ($p = 0.007$), with a higher frequency observed in the younger dogs. According to Brown et al. (2006), young dogs that have been weaned are particularly likely to be exposed to concomitant diseases because malnourishment due to a scavenging lifestyle greatly predisposes these animals to infection. A significant correlation was observed between a decrease in platelets and *B. vogeli* ($p = 0.01$) occurrence, which has been previously reported by Santos et al. (2009) and Brown et al. (2006). The mechanism of platelet damage by *B. vogeli* is poorly understood. In human chronic babesial infections, it has been suggested that spleen enlargement results in an increase in the pooling of platelets, diminishing circulating thrombocytes (PANTANOWITZ, 2003).

None of tested samples was positive for *Hepatozoon* spp., as determined by PCR. This could be attributed to the fact that *R. sanguineus* was the sole tick found on the studied animals. *R. sanguineus* is considered to be the main *H. canis* vector in the Old World (BANETH et al., 2007), and its presence on dogs has been associated with pathogen infection (SPOLIDORIO et al., 2009). However, until now, there is no report of *R. sanguineus* naturally or experimentally infected with *H. canis* in Brazil (FORLANO et al., 2005; SPOLIDORIO et al., 2009; DEMONER et al., 2013). These negative results could be related to the different susceptibilities of *R. sanguineus* populations to *H. canis* because it has been shown that the taxon *R. sanguineus* is represented by at least two different species in Latin America (MORAES-FILHO et al., 2011).

PCR revealed that three animals possessed co-infection with *E. canis* and *B. vogeli*. This co-infection, which has been reported elsewhere (SANTOS et al., 2009; RAMOS et al., 2010), occurs because these pathogens share the same vector, the brown dog tick *R. sanguineus*, which was predominant in the animals evaluated in this study.

Conclusions

The results from the present study revealed that *E. canis* was the main tick-borne pathogen of dogs in Patos and showed that *B. vogeli* is an important hemoparasite that should be included in the differential diagnosis performed by veterinary medical professionals. These findings are very important for the understanding of the epidemiology of tick-borne pathogens of domestic dogs in this semiarid region of Brazil.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Aguiar DM, Saito TB, Hagiwara MK, Machado RZ, Labruna MB. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis* [portuguese]. *Cienc Rural* 2007; 37(3): 796-802.
- Aguiar DM, Ziliani TF, Zhang X, Melo AL, Braga IA, Witter R, et al. A novel Ehrlichia genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5(5):537-44.
- Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, et al. *Coxiella symbiont* in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3(4): 203-206.
- Almeida AP, Souza TD, Marcili A, Labruna MB. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *J Med Entomol* 2013; 50(3): 640-646.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3): 403-410.

Baneth G, Barta JR, Shkap V, Martin DS, Macintire DK, Vincent-Johnson N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1298-1301.

Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol* 2007; 93(2): 283-299.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara G.H. *Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical*, São Paulo: Instituto Butantan; 2006.

Bartsch RC, Greene RT. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *J Vet Intern Med* 1996; 10(4): 271-274.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9):2645-2651.

Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, Roberts TK, Martin AR, Brown CS, et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Aust Vet J* 2006; 84(9):321-325.

Bulla C, Takahira RK, Araújo Jr. JP, Trinca LA, Lopes RS, Wiedmeyer CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet Res* 2004; 35(1): 141-146.

Carlos RSA, Neta ESM, Spagnol FH, Oliveira LLS, Brito RLL, Albuquerque GR, et al. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus-Itabuna, State of Bahia, Brazil [portuguese]. *Rev Bras Parasitol Vet* 2007; 16(3):117-120.

Carvalho FS, Wenceslau AA, Carlos RSA, Albuquerque GR. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7(3):657-662.

Cruz AC, Zwegarth E, Ribeiro MF, da Silveira JA, de la Fuente J, Grubhoffer L, et al. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasit Vectors* 2012; 5:291.

Dagnone AS, Morais HSA, Vidotto MC, Jojima FS, Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 117(4):285-290.

Dantas-Torres F, Figueiredo LA, Brandão-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(1):64-67.

Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet Parasitol* 2008; 152(3-4):173–185.

Demoner LC, Rubini AS, Paduan KS, Metzger B, de Paula Antunes JM, Martins TF, et al. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4(6):542-546.

Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corsvet RE, Hegarty BC, et al. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the *dsb* gene. *J Mol Diagn* 2005; 7(4):504-510.

Forlano M, Scofield A, Elisei C, Fernandes KR, Ewing SA, Massard CL. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 134(1-2): 1-7.

Gal A, Loeb E, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet J* 2007; 175(2): 212-217.

Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(11):4488–4490.

Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J* 2011; 187(3): 292-296.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York: Wiley; 1989.

Irwin PJ, Hutchinson GW. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Aust Vet J* 1991; 68(6): 204–209.

Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors* 2009; 2; doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4.

Jain NC. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger ;1993.

Krawczak FDS, Labruna MB, Sangioni LA, Vogel FSF, Soares JF, Lopes STDA. Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(4): 415–417.

Labruna MB, McBride JW, Camargo LM, Aguiar DM, Yabsley MJ, Davidson WR, et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet Parasitol* 2007; 143(2):189–195.

Machado RZ, Duarte JM, Dagnone AS, Szabó MP. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Vet Parasitol* 2006; 139(1-3): 262-266.

Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop* 2011; 117(1): 51-55.

Murata T, Shiramizu K, Hara Y, Inoue M, Shimoda K, Nakama S. First Case of *Hepatozoon Canis* Infection of a dog in Japan. *J Vet Med Sci* 1991; 53(6): 1097-1099.

Pantanowitz L. Mechanisms of thrombocytopenia in tick-borne diseases. *IJID* 2003; 2(2): 291-298.

Oliveira LS, Oliveira KA, Mourão LC, Pescatore AM, Almeida MR, Conceição LG, et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2009; Suppl 2:55-56.

Passos LM, Geiger SM, Ribeiro MF, Pfister K, Zahler-Rinder M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 127(1): 81–85.

Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:110-117.

Ramos R, Ramos C, Araújo F, Oliveira R, Souza I, Pimentel D, et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol Res* 2010; 107(5): 1115-1120.

Santos F, Coppede JS, Pereira AL, Oliveira LP, Roberto PG, Benedetti RB, et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet J* 2009; 179(1): 145-148.

Santos LG, Melo AL, Moraes-Filho J, Witter R, Labruna MB, Aguiar DM. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22(1): 114-118.

Solano-Gallego L, Lull J, Osso M, Hegarty B, Breitschwerdt E. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res* 2006; 37(2):231–244.

Souza BMPS, Leal DC, Barboza DCPM, Uzêda RS, De Alcântara AC, Ferreira F, et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19(2): 89-93.

Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliari KM, Yoshinari NH. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 163(4):357-61.

Spolidorio MG, Torres MM, Campos WN, Melo AL, Igarashi M, Amude AM, et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(3): 253-255.

Tanikawa A, Labruna MB, Costa A, Aguiar DM, Justiniano SV, Mendes RS, et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Res Vet Sci* 2012; 94(3): 474-477.

Thursfield M. *Veterinary Epidemiology*. Oxford : Wiley Blackwell; 2007.

Trapp SM, Dagnone AS, Vidotto O, Freire RL, Amude AM, Morais HSA. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet Parasitol* 2006; 140(3-4): 223–230.

Vieira RFC, Biondo AB, Guimarães AMS, Santos AP, Santos RP, Dutra LH, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 1-12.

Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991; 21(1): 45-98.

Yoder JA, Benoit JB, Rellinger EJ, Tank JL. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Med Vet Entomol* 2006; 20(4):365-372.

Table 1. Selected variables in univariate analysis associated with the *Babesia* spp.-specific PCR results for the dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil.

Variable	Category	Number	Positive (%)	P-value
Age (months)	6 – 12	36	8 (22.2%)	0.009
	12 – 48	23	1 (4.3%)	
	>48	41	1 (2.4%)	
Food	Commercial	19	3 (15.8%)	0.170
	Homemade	23	0 (0%)	
	Commercial / Homemade	58	7 (12.1%)	
Floor of dog's premises	Ground	11	0 (0%)	0.105
	Cement	49	8 (16.3%)	
	Ground / Cement	40	2 (5%)	

Table 2. Selected variables in univariate analysis associated with the *Ehrlichia canis*-specific IFA and PCR results for the dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil.

Variable	Category	Number	IFAT		PCR	
			(Titer ≥ 80)			
			N° positive dogs (%)	P-value	N° positive dogs (%)	P-value
	< 2	38	9 (23,7)		7 (18,4)	
Dog's owner income (minimum wage)	2-4	53	23 (43,4)	0,215	15 (28,3)	0,618
	5-6	4	1 (25)		1 (25)	
	>6	5	1 (20)		2 (40)	
Dog's gender	Male	50	18 (36)	0,833	8 (16)	0,065
	Female	50	16 (32)		17 (34)	
Age (months)	6 – 12	36	19 (52,8)	0,011	9 (25)	0,4
	12 – 48	23	6 (26,1)		8 (34,8)	
	>48	41	9 (22)		8 (19,5)	

Table 2. Selected variables in univariate analysis associated with the *Ehrlichia canis*-specific IFA and PCR results for the dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba, Brazil. (continuation).

Variable	Category	Number	IFAT (Titer ≥ 80)		PCR	
			N ^o positive dogs (%)	P-value	N ^o positive dogs (%)	P-value
Breed	Mixed breed	59	21 (35,6)	0,850	12 (20,3)	0,197
	Pure breed	41	13 (31,7)		13 (31,7)	
Floor of dog's premises	Ground	11	1 (9,1)	0,158	2 (18,2)	0,838
	Cement	49	17 (34,7)		13 (26,5)	
	Ground/Cement	40	16 (40)		10 (25)	
Vaccination	Yes	78	21 (26,9)	0,011	20 (25,6)	1,000
	No	22	13 (59,1)		5 (22,7)	

ARTIGO 3

A ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Estudo de prevalência e fatores de risco de Erliquiose Monocítica Canina e outras rickettsioses em cães, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Tereza E. de F. Rotondano, Werona B. de Oliveira, Felipe da S. Krawzack, Jonas Moraes-Filho, Fernanda N. Bastos, Marcelo B. Labruna, Sérgio S. de Azevedo, Marcia A. de Melo, Alzira M.P. de Almeida.

Nesse artigo se buscou conhecer a ocorrência de erliquiose monocítica canina (EMC) e outras rickettsioses em cães, amostrados aleatoriamente, de cinco diferentes municípios do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. De cada animal, obteve-se amostra de sangue com posterior aplicação de questionário epidemiológico ao seu proprietário. As amostras foram testadas por PCR em tempo real (qPCR), visando a detecção de DNA específico de *Ehrlichia canis* e, por RIFI, na busca de anticorpos direcionados para *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephalii*, *R. amblyommi* e *R. felis*. Através de análise estatística a ocorrência de *E. canis* foi associada aos regimes de criação solto e semi-domiciliar, assim como ao fato dos proprietários serem analfabetos ou terem cursado apenas o primeiro grau de ensino. 5,76 % das amostras analisadas por RIFI foram positivas para pelo menos uma das espécies de *Rickettsia*. Este é o primeiro estudo epidemiológico com análise de fatores de risco relatando pela primeira vez o encontro de *E. canis* e *Rickettsia* spp, em cães no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Estudo de prevalência e fatores de risco de Erliquiose Monocítica Canina e outras rickettsioses em cães, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil¹

Tereza E. de F. Rotondano², Werona B. de Oliveira³, Felipe da S. Krawczak⁴, Jonas Moraes-Filho⁴, Fernanda N. Bastos⁴, Marcelo B. Labruna⁴, Sérgio S. de Azevedo⁵, Marcia A. de Melo⁵, Alzira M.P. de Almeida⁶

Abstract - Rotondano, T.E.F., Oliveira W.B., Krawczak F.S., Moraes-Filho J., Bastos F.N., Labruna M.B., Azevedo S.S., Melo M.A. & Almeida A.M.P. 2013. [**Study of prevalence and risk factors of Canine Monocytic Ehrlichiosis and other rickettsial infections in dogs, in the State of Paraíba, Northeast Brazil.**] Estudo de prevalência e fatores de risco de Erliquiose Monocítica Canina e outras rickettsioses em cães, no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.*Autor para correspondência: terezarotondano@hotmail.com

Knowing the tick transmitted pathogens circulating in canine populations and the factors favoring diseases development is required for early diagnosis and control, and prevent the occurrence of human cases in a region. This study assessed for the first time the occurrence of canine monocytic ehrlichiosis (CME) and other rickettsial infections in dogs in the State of Paraíba, northeastern Brazil, and evaluated possible risk factors associated with these diseases. Blood samples from dogs randomly selected in five cities were collected, along with application of an epidemiologic questionnaire to get information on dogs and their owners. The samples were

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Campus da UFPE, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.*Autor para correspondência: terezarotondano@hotmail.com

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semiárido, Avenida Francisco Mota, 572, Presidente Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brasil

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Orlando Marques de Paiva 87, 05508-270, São Paulo, SP, Brasil

⁵ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, 58.700-970 Patos, PB, Brasil

⁶ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Campus da UFPE, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901, Recife, PE, Brasil

analyzed by real time PCR (qPCR) for *Ehrlichia canis* DNA, and Immunofluorescence Assay (IFAT) for antibodies to the species *Rickettsia rickettsii*, *R. felis*, *R. parkeri*, *R. amblyomii* and *R. rhipicephali*. *E. canis* DNA was detected in 8.9% (64/719) samples; household and semi-household breeding and dog owner's illiterate or primary school education level were considered risk factors for *E. canis*. Antibodies to at least one of the *Rickettsia* antigens was found in 5.76% (44/763) animals by IFAT. Significant association was observed between *R. rickettsii* and vermifugated dogs, and between *R. parkeri* and contact between dogs and cats. The dogs' sex (male) and contact with wild animals were considered risk factors associated with *R. amblyomii*. This is the first epidemiological study on prevalence and analysis of associated risk factors and reports for the first time occurrence of *E. canis* and *Rickettsia* spp., in dogs in the State of Paraíba, Northeast Brazil.

INDEX TERMS: *Ehrlichia canis*, rickettsiosis, qPCR, IFAT, dogs and northeastern Brazil.

RESUMO- Conhecer os patógenos transmitidos por carrapatos, que circulam nas populações caninas e os fatores que favorecem o aparecimento das doenças é necessário para alcançar o diagnóstico precoce e o controle, e evitar a ocorrência de casos humanos na região. No presente estudo foi pesquisada pela primeira vez a ocorrência de erliquiose monocítica canina (EMC) e outras rickettsioses em cães e os possíveis fatores de risco associados a essas doenças no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Amostras de sangue de cães selecionados aleatoriamente em cinco municípios foram coletadas, juntamente com a aplicação de um questionário epidemiológico para obtenção de informações sobre os cães e seus proprietários. As amostras foram analisadas por PCR em tempo real (qPCR), para detecção de DNA de *Ehrlichia canis* e, por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para identificação de anticorpos contra as espécies *Rickettsia rickettsii*, *R. felis*, *R. parkeri*, *R. amblyomii* e *R. rhipicephali*. DNA de *E. canis* foi detectado por qPCR em 8,9% (64/719) amostras e os regimes de criação solto e semi-domiciliar, bem como os proprietários serem analfabetos ou terem apenas o primeiro grau de ensino foram considerados como fatores de risco para *E. canis*. 5,76% (44/763) das amostras foram positivas para pelo menos um dos antígenos testados por RIFI. Foi observada associação significativa entre *R. rickettsii* e o ato de vermifugar os animais e a associação entre *R. parkeri* e o contato dos cães com gatos. O sexo dos cães (macho) e o contato com animais silvestres foram considerados fatores de risco associados à *R. amblyomii*. Este estudo revela pela primeira vez a ocorrência de *E. canis* e *Rickettsia* spp, em cães no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Ehrlichia canis*, rickettsioses, qPCR, RIFI, cães e Nordeste do Brasil.

INTRODUÇÃO

Rickettsioses são doenças de transmissão vetorial causadas por bactérias da ordem Rickettsiales, a qual inclui duas famílias (Rickettsiaceae e Anaplasmataceae) de patógenos intracelulares obrigatórios. Os organismos da família Rickettsiaceae crescem livres no citoplasma das células do hospedeiro, enquanto que os da família Anaplasmataceae se replicam dentro de um vacúolo derivado da membrana da célula hospedeira (Dumler et al. 2001). As rickettsioses ocorrem mundialmente e são transmitidas por uma variedade de espécies de carrapatos, cada uma com exigências específicas (Szabó et al. 2013). Assim, a epidemiologia das várias rickettsioses é determinada pela distribuição geográfica específica do carrapato vetor.

Entre os membros da família Anaplasmataceae, *Ehrlichia canis* é a principal espécie incriminada como agente causador da erliquiose monocítica canina (EMC) no Brasil. A EMC é uma doença multissistêmica que se manifesta nas formas aguda, subclínica ou crônica dependendo da virulência da cepa infectante e ocorrência de co-infecção, principalmente com outros patógenos transmitidos por artrópodes, como *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis* (Gal et al. 2007). O diagnóstico da doença consiste na observação de mórulas em leucócitos, através exame de esfregaço sanguíneo, isolamento da bactéria em cultivo celular, pesquisa de anticorpos por imunofluorescência (RIFI) e na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, reconhecido como vetor da EMC em muitas partes do Brasil (Vieira et al. 2011), vem sendo incriminado também como vetor da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) (Demma et al., 2005) e provavelmente da Febre Maculosa Brasileira (FMB) (Szabó et al. 2013).

No Brasil, a ocorrência de bactérias da ordem Rickettsiales tem sido relatada por diversos autores (Labruna et al. 2007, Pinter et al. 2008, Saito et al. 2008). Até o ano de 2000 apenas uma espécie da família Rickettsiaceae, *Rickettsia rickettsii*, incluída no Grupo da Febre Maculosa (GFM) era reconhecida no Brasil, mas a partir daí foi registrada a ocorrência de outras espécies: *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. felis* (Labruna et al. 2011).

Pesquisar locais que possuem potencial para desenvolver condições para o aparecimento destas doenças, como presença de carrapatos vetores e seus hospedeiros, e a pesquisa dos agentes responsáveis que circulam numa população são importantes para alcançar o diagnóstico precoce, tratamento e controle além de impedir a ocorrência de casos em humanos (Galvão et al. 2005).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de *E. canis* e *Rickettsia* spp. em cães no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, bem como avaliar possíveis fatores de risco associados a esses patógenos na região.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Uiraúna (6°57'S, 38°24'W), Cajazeiras (6°53'S, 38°33'W), Sousa (6°45'S, 38°13'W), Campina Grande (7°13'S, 35°52' W) e Areia (6°57'S, 35°41'W), localizados nas mesorregiões do sertão e agreste do estado da Paraíba, região Nordeste do Brasil (Fig. 1).

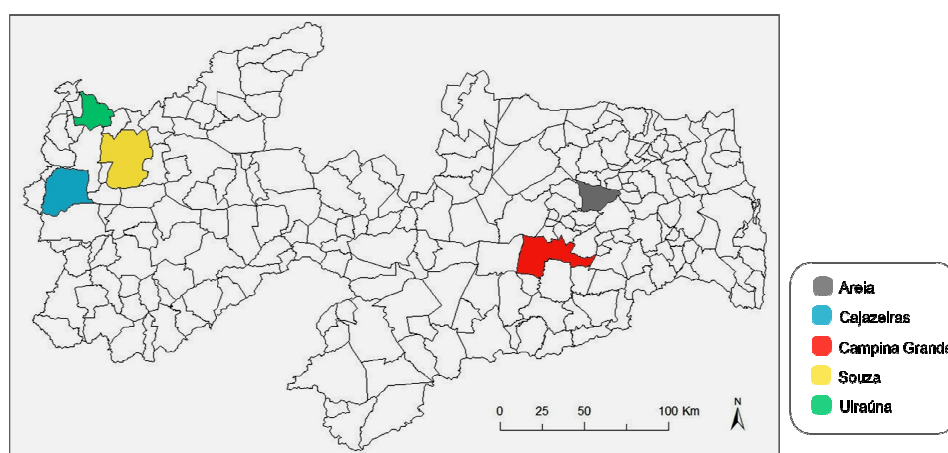


Fig.1 Localização geográfica dos municípios do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, onde foram coletadas as amostras de sangue dos cães do estudo.

Coleta das amostras

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção cefálica ou jugular em tubos vacutainer contendo citrato de sódio, em cães selecionados de forma aleatória, provenientes de zona urbana dos cinco municípios. Após a coleta, alíquotas de sangue total e plasma foram separadas e acondicionadas a -20°C até realização das análises sorológicas e moleculares. 763 amostras foram obtidas para detecção de *Rickettsia* spp. e 719 para detecção de *E. canis* (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição, por município, das amostras sorológicas de cães analisadas para detecção de *Rickettsia* spp. por imunofluorescência indireta (RIFI) e *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) no Estado da Paraíba, Brasil

Número de amostras analisadas (número de amostras positivas) e percentual (%)		
Município	<i>Rickettsia</i> spp. (RIFI)	<i>Ehrlichia canis</i> (qPCR)
Uiraúna	100 (2) 0,26 %	100 (14) 1,94%
Cajazeiras	97 (5) 0,65%	74 (7) 0,97%
Sousa	89 (9) 1,17%	68 (4) 0,55%
Areia	101 (9) 1,17%	101 (15) 2,08
Campina Grande	376 (47) 6,15%	376 (24) 3,33%
Total	763 (72) 9,43%	719 (64) 8,90%

Aplicação de questionário epidemiológico

Um questionário epidemiológico era aplicado no momento de cada coleta para se obter informações gerais acerca dos proprietários (grau de escolaridade e renda), e dos animais (idade, sexo, raça, tipo de criação, alimentação, contato com outros animais, ambiente de criação e sua limpeza, vacinação, vermifugação e histórico de infestação de carrapatos).

Detecção de *Ehrlichia canis*

Extração de DNA e Amplificação

O DNA total foi extraído a partir das amostras de sangue total, como recomendado por Rotondano et al. (2012) utilizando-se kit de extração de DNA comercial (Wizard kit for DNA extraction[®]) seguindo as recomendações do fabricante (Promega), e eluído em 50 µL de tampão de eluição disponível no kit.

A detecção de *E. canis* foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) para amplificar o gene *dsb* que codifica a proteína de formação de ponte dissulfídica utilizando os primers Dsb 321 (5'-TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA-3') e Dsb 671 (5'-GCTGCTCAACCAAGAAATGTATCCCCTA - 3'), e uma sonda espécie-específica (5'-FAM

AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-BHQ-1-3') na concentração de 25 µmol/L como descrito anteriormente (Doyle et al., 2005).

Deteção de *Rickettsia* spp.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As amostras de soro foram analisadas por imunofluorescência indireta (RIFI), seguindo Horta et al. (2004) e Labruna et al. (2007), utilizando-se lâminas com antígenos brutos de cinco espécies de rickettsias: *R. rickettsii*, *R. felis*, *R. parkeri*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali*. As amostras foram examinadas em microscópio de epifluorescência OLIMPUS®, inicialmente numa diluição de triagem (1:64), e para determinação do título final para cada espécie as amostras positivas foram sucessivamente diluídas, em PBS, na razão dois até 1:2048. Foram considerados como positivos soros com título ≥ 64 . Soros comprovadamente reagente (positivo) e não reagente (negativo) foram utilizados como controle em cada lâmina testada com as amostras dos animais. Os resultados foram interpretados segundo Horta et al. (2004) e Labruna et al. (2007): as amostras com títulos para alguma espécie de rickettsia, no mínimo, quatro vezes maior que o observado para as outras espécies testadas foram consideradas homólogas, ou genotipicamente muito próximas, à espécie de maior titulação.

Análise Estatística

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, as variáveis que apresentaram valor de $p \leq 0,2$ pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado, foram selecionadas para a análise multivariada utilizando-se a regressão logística múltipla (Hosmer & Lemeshow 2000). Para execução dos testes a soropositividade para *Rickettsia* spp. e a deteção molecular de *E. canis* foram consideradas como variáveis dependentes, e os dados obtidos nos questionários epidemiológicos, como variáveis independentes, com nível de significância de 5%. Os resultados sorológicos foram analisados utilizando a variável dicotômica seguinte: (i) cães com sorologia negativa ou reagente com título < 64 (0), e (ii) cães com títulos finais ≥ 64 (1). Todas as análises foram realizadas pelo programa *SPSS 13.0 for Windows*.

Considerações Éticas

O presente trabalho foi submetido e aprovado em Comitê de Ética da Universidade Federal de Campina Grande.

RESULTADOS

Detecção de DNA de *Ehrlichia canis* por qPCR

Amplificação do DNA de *E. canis* foi obtida em 64 das 719 amostras analisadas por qPCR (8,9%). A distribuição por município das amostras de sangue dos cães analisadas, positivas e percentuais de positividade são mostrados no Quadro 1.

Foram considerados como fatores de risco associados à ocorrência de erliquiose os regimes de criação solto ($p=0,011$) e semi-domiciliar ($p=0,0001$) como também o fato dos proprietários serem analfabetos ou terem cursado apenas o 1º grau ($p=0,021$) (quadro 2).

Detecção de *Rickettsia* spp.

Das 763 amostras analisadas por RIFI, 44 (5,76%) apresentaram títulos ≥ 64 e foram consideradas positivas para pelo menos um dos antígenos testados.

Os títulos finais dos soros positivos variaram de 64 a 512 para *R. rickettsii*, 64 a 1024 para *R. parkeri* e *R. rhipicephalii*, 128 a 2048 para *R. amblyommii* e 64 a 512 para *R. felis*.

Em três animais foi observado reação homóloga para *R. amblyommi*, *R. felis* e *R. rickettsii* com título final (512) quatro vezes superior ao dos demais antígenos testados (quadro 3).

Nos outros animais sororeativos não foi possível discriminar o agente porque os títulos encontrados foram semelhantes (diferença < 4 vezes) para dois ou mais antígenos ou foi encontrado um único título $= 64$ para uma única espécie de *Rickettsia*.

Não houve diferença estatística, em relação à frequência dos agentes, entre os municípios: *R. rickettsii* ($p=0,319$), *R. parkeri* ($p=0,089$), *R. rhipicephali* ($p=0,501$), *R. amblyommii* ($p=0,263$) e *R. felis* ($p=0,734$).

A análise dos fatores de risco (quadro 4) revelou associação significativa entre a positividade para *R. rickettsii* e o ato de vermifugar os animais ($p=0,017$), assim como verificado para *R. parkeri* ($p=0,03$), a qual também foi associada ao contato dos cães com gatos ($p=0,005$). O sexo dos animais (macho) e o contato com animais silvestres foram considerados fatores de risco associados à ocorrência de *R. amblyommi* ($p=0,018$ e $p=0,002$, respectivamente).

Quadro 2. Análise Univariada dos fatores de risco associados à positividade para *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) em cães no Estado da Paraíba

Variável	Categoria	qPCR		
		Total de animais	Positivos (%)	Valor de p
Grau de escolaridade do proprietário ^a	Analfabeto / 1º grau incompleto / 1º grau completo	341	44 (12,9)	0,001
	2º grau incompleto / 2º grau completo	252	15 (6,0)	
	3º grau incompleto / 3º grau completo	126	5 (4,0)	
Renda familiar do proprietário ^a	Menos de 2 salários mínimos	421	47 (11,2)	0,026
	2 a 4 salários mínimos	228	15 (6,6)	
	5 ou mais salários mínimos	70	2 (2,9)	
Sexo do animal ^a	Macho	411	46 (11,2)	0,018
	Fêmea	308	18 (5,8)	
Idade do animal	6 – 12 meses	122	9 (7,4)	0,927
	12 – 24 meses	133	11 (8,3)	
	24 a 48 meses	184	16 (8,7)	
	4 a 6 anos	145	14 (9,7)	
	Acima de 6 anos	135	14 (10,4)	

Quadro 2. Análise Univariada dos fatores de risco associados à positividade para *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) em cães no Estado da Paraíba (continuação)

Variável	Categoria	qPCR		
		Total de animais	Positivos (%)	Valor de p
Raça do animal	Sem raça definida	554	58 (10,5)	0,011
	Com raça definida	165	6 (3,5)	
Tipo de Criação	Domiciliar	443	23 (5,2)	0,0001
	Semi-domiciliar	190	23 (12,1)	
	Solto	86	18 (20,9)	
Alimentação	Ração comercial	123	5 (4,1)	0,001
	Alimento preparado em casa	311	42 (13,5)	
Contato com animais	Ambos	285	17 (6)	0,041
	Sim	569	57 (10)	
Contato com Equídeos	Não	150	7 (4,7)	0,961
	Sim	6	0 (0)	
Contato com Silvestres	Não	713	64 (9)	1,000
	Sim	136	12 (8,8)	
Contato com Felinos	Não	583	52 (8,9)	0,041
	Sim	48	30 (12,1)	
	Não	471	34 (7,2)	

Quadro 2. Análise Univariada dos fatores de risco associados à positividade para *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) em cães no Estado da Paraíba (continuação)

Variável	Categoria	qPCR		
		Total de animais	Positivos (%)	Valor de p
Contato com Caninos	Sim	415	41 (9,9)	0,345
	Não	304	23 (7,6)	
Contato com Suínos	Sim	10	2 (20)	0,495
	Não	709	62 (8,7)	
Contato com Outros animais	Sim	31	3 (9,7)	1,000
	Não	688	61 (8,9)	
Outras Formas de Contato	Sim	629	59 (9,4)	0,320
	Não	90	5 (5,6)	
Ambiente de criação	Terra	232	30 (12,9)	0,004
	Cimento	263	12 (4,6)	
	Ambos	224	22 (9,8)	
Limpeza do ambiente	Sim	646	49 (7,6)	0,001
	Não	73	15 (20,5)	
Frequência de Limpeza do Ambiente	Diária	551	40 (7,3)	0,009
	Semanal	71	7 (9,9)	
	Quinzenal	17	2 (11,8)	
	Mensal /não realizada	80	15 (18,8)	

Quadro 2. Análise Univariada dos fatores de risco associados à positividade para *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real (qPCR) em cães no Estado da Paraíba (continuação)

Variável	Categoria	qPCR		
		Total de animais	Positivos (%)	Valor de p
Vacinação	Sim	604	54 (8,9)	1,000
	Não	115	10 (8,7)	
Vermifugação	Sim	419	28 (6,7)	0,019
	Não	300	36 (12)	
Histórico de carrapatos	Sim	613	56 (9,1)	0,730
	Não	106	8 (7,5)	

^a Variáveis selecionadas para análise multivariada

Quadro 3. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para 5 espécies de *Rickettsia* em cães do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

<i>Localidade</i>	<i>Nº de cães testados</i>	<i>Número de cães sororeagentes a cada uma das espécies de Rickettsia</i>					<i>Nº de cães com possível reação homóloga (PAERH^a)</i>
		<i>(% soropositividade por localidade)</i>					
		<i>R.rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. felis</i>	
Uiraúna	100	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0
Cajazeiras	97	1 (1,03)	0 (0)	2 (2,06)	1 (1,03)	1 (1,03)	0
Sousa	89	2 (2,24)	4 (4,49)	1 (1,12)	2 (2,24)	0 (0)	0
Areia	101	1 (0,99)	2 (1,98)	2 (1,98)	3 (2,97)	1 (0,99)	2 (1 <i>R. amblyommii</i> , 1 <i>R. felis</i>)
Campina Grande	376	9 (2,39)	13(3,45)	7 (1,86)	16 (4,25)	2 (0,23)	1 (1 <i>R. rickettsii</i>)
Total	763	13	20	12	23	4	

^a-PAERH: Possível antígeno envolvido na reação homóloga

Quadro 4. Análise de regressão logística múltipla dos fatores de risco associados à positividade para *Rickettsia* spp. em cães no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

<i>Espécie</i>	<i>Fator de risco</i>	<i>Odds ratio</i>	<i>Intervalo de Confiança (IC)</i>	<i>Valor de p</i>
			<i>95%</i>	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Animal ter sido vermifugado	6,46	[1,39 - 30,04]	0,017
<i>Rickettsia parkeri</i>	Contato com gatos	3,85	[1,51 - 9,83]	0,005
	Animal ter sido vermifugado	3,43	[1,13 - 10,45]	0,030
<i>Rickettsia amblyommii</i>	Animal ser macho	3,76	[1,26 - 11,22]	0,018
	Contato com animais silvestres	3,77	[1,61 - 83]	0,002

DISCUSSÃO

No presente estudo foi pesquisada pela primeira vez no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil a ocorrência de erliquiose monocítica canina (EMC) e outras rickettsioses em cães e os possíveis fatores de risco associados a essas doenças.

No Brasil os estudos sobre rickettsias causadoras ou não da FMB realizados em áreas não endêmicas são escassos; a maioria das pesquisas foi realizada em áreas de ocorrência dos casos ou onde a doença se apresenta de forma endêmica (Melo et al. 2011, Spolidório et al. 2013). O estudo epidemiológico acerca da ocorrência de *E. canis* em cães no Estado da Paraíba permitiu evidenciar pela primeira vez a ocorrência deste agente na área estudada.

Dentre as amostras analisadas no presente trabalho 8,9% (64/719) apresentaram DNA de *E. canis*. Esta prevalência está bem abaixo da relatada por Vieira et al. (2011) para a região Nordeste, considerando os estudos nos Estados do Ceará, Pernambuco, Alagoas e Bahia. Entretanto, esta alta prevalência de *E. canis* na região poderia estar superestimada considerando que apenas ferramentas sorológicas, menos precisas, foram utilizadas nas pesquisas. No nosso estudo além da maior sensibilidade diagnóstica e analítica da técnica qPCR empregada (Doyle et al., 2005; Harrus & Waner, 2011) foi possível se identificar não apenas uma exposição ao agente, mas sim casos de infecção ativa nos quais o DNA erliquial foi detectado a partir de sangue total de cães domiciliados, o que demonstra a real situação da EMC no Estado da Paraíba.

Os regimes de criação solto ($p=0,011$) e semi-domiciliar ($p=0,0001$) bem como o fato dos proprietários serem analfabetos ou terem cursado apenas o primeiro grau de ensino ($p=0,021$) foram considerados como fatores de risco associados à ocorrência de EMC. Animais criados soltos ou que passam parte do dia fora de casa, estão sujeitos a uma maior exposição à infestação por carrapatos e à infecção por outras diversas doenças que podem levar a um déficit imunológico e maior predisposição à EMC. O grau de instrução do proprietário está diretamente ligado à qualidade no manejo do animal no que diz respeito, por exemplo, à alimentação, vacinação e limpeza do ambiente e do próprio animal; um baixo grau de escolaridade pode repercutir na falta de informação acerca desses cuidados fazendo com que a falta de instrução represente um fator de risco para a ocorrência de erliquiose.

A RIFI é o teste de escolha para o diagnóstico sorológico de infecção rickettsial em seres humanos e animais (Breitschwerdt et al., 1998; La Scola et al., 1997; Parola et al., 2005), mas reação cruzada entre as espécies de *Rickettsia* é frequentemente observada, dificultando a identificação das espécies envolvidas na infecção. Segundo La Scola et al., (1997) e Parola et al., (2005) o ideal é sempre investigar as espécies de *Rickettsia* de ocorrência conhecida na região,

porque os títulos de anticorpos homólogos são sempre superiores aos títulos de anticorpos heterólogos. Em alguns casos as diferenças nos títulos podem ser altas o suficiente para diferenciar as espécies rickettsiais envolvidas na estimulação da resposta imune.

No nosso trabalho 5,76% das amostras foram positivas por RIFI para pelo menos um dos antígenos de *Rickettsia* pesquisados (título ≥ 64). Segundo Piranda et al. (2008) a presença de animais sororeagentes indica a circulação de *Rickettsia* do GFM, em uma determinada área, pelo menos nos últimos 6-18 meses.

Na condição de hospedeiro para os carrapatos vetores da FMB, o cão pode ser utilizado como importante sentinela em estudos de vigilância epidemiológica. Segundo Lemos et al. (1997), a prevalência de reações sorológicas positivas em cães de uma área geográfica evidencia o risco de infecção humana.

O presente trabalho detectou pela primeira vez, através de evidência sorológica a ocorrência de *Rickettsia* spp. em cães no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil e, em três amostras foi possível determinar o provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAERH): *R. amblyommii*, *R. felis* e *R. rickettsii* (quadro 3). Nos outros animais sororeativos não foi possível discriminar o agente por exibirem títulos semelhantes (diferença < 4 vezes) para dois ou mais antígenos ou terem um único título (64) para uma única espécie de *Rickettsia*. A *R. rickettsii* é um conhecido patógeno canino ao passo que a infecção em cães por *R. amblyommii* se restringe apenas a relatos de evidência sorológica desse agente (Breitschwerdt et al. 1988, Labruna et al. 2007).

Até o momento os únicos agentes implicados em doença em seres humanos no Brasil, transmitidas por carrapatos, são *R. rickettsii* (Angerami et al., 2006) e *R. parkeri* (Spolidorio et al., 2010). A patogenicidade de *R. amblyommii* ainda não está bem esclarecida, mas alguns casos presumivelmente causados por *R. rickettsii* (FMMR) nos Estados Unidos podem ser atribuídos à infecção por *R. amblyommii* (Apperson et al., 2008).

No Brasil duas espécies de carrapatos são incriminadas como transmissores da *R. rickettsii* aos homens e aos animais: *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* (Dias & Martins 1939; Pinter & Labruna 2006), sendo *A. cajennense* o vetor mais comumente associado à doença (Moreira; Magalhães, 1935). A participação de *R. sanguineus* (o carrapato marrom do cão) na epidemiologia de *R. rickettsii* no Brasil foi evidenciada pela primeira vez em uma área endêmica da região metropolitana de São Paulo (Moraes-Filho et al. 2009) mas o papel do *R. sanguineus* na transmissão de *R. rickettsii* já havia sido confirmado nos EUA (Nicholson et al. 2006) e no México (Bustamante & Varela 1947), além de suspeitado na Colômbia (Labruna et al. 2007).

Até o presente não havia estudos acerca dos carrapatos que infestam cães no Estado da Paraíba salvo um relato de *R. sanguineus* infestando cães no município de Patos (Tanikawa et al. 2012).

Considerando que *R. sanguineus* é o principal carrapato que parasita cães no Brasil, principalmente em áreas urbanas (Labruna 2004), que as condições climáticas de baixa disponibilidade de água e umidade, características da região em estudo, favorecem o predomínio dessa espécie (Yoder et al., 2006) e ainda que se trata de um vetor competente podendo desempenhar importante papel na transmissão dos agentes da febre maculosa em situações específicas (Piranda et al., 2011, Demma et al. 2005, Szabó et al. 2013) é provável que esse vetor possa estar envolvido na disseminação de rickettsioses no Estado da Paraíba. Entretanto, outros estudos são necessários para comprovação.

Apesar de ter como vetor pulgas do gênero *Ctenocephalides*, ectoparasito comum de cães, (Raoult & Roux, 1997) apenas quatro animais apresentaram anticorpos para *R. felis* e, em um caso, foi possível reconhecer esta espécie como antígeno homólogo envolvido na infecção. A detecção sorológica de *R. felis* em cães na região em estudo tem importante significado já que a espécie foi confirmada por técnicas sorológicas e moleculares em humanos, no Estado de Minas Gerais e está incluída no grupo das febres maculosas por análise filogenética (Bacellar et al 1995, Angeloni et al. 1997, Lakos & Raoult 1999, Oliveira et al. 2002, Galvão et al. 2002).

A análise dos fatores de risco demonstrou associação significativa entre a positividade para *R. rickettsii* e o ato de vermifugar os animais ($p=0,017$). Essa mesma associação foi encontrada para *R. parkeri* ($p=0,03$) a qual também foi correlacionada ao contato dos cães com gatos ($p=0,005$). O sexo dos animais (macho) e o contato com animais silvestres foram considerados fatores de risco associados à ocorrência de *R. amblyommi* ($p=0,018$ e $p=0,002$, respectivamente).

A ocorrência de *Rickettsia* spp. e a sua associação com esses fatores de risco no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil ainda não havia sido relatada. Considerando que vários são os hospedeiros silvestres das riquetsioses, incluindo roedores (capivara), aves, serpentes, morcegos, peixes, antas e gambás e, que animais domésticos como cães, gatos, equinos e aves também possuem grande potencial para serem parasitados (Dias & Martins, 1939, Lemos 2002, Vianna 2002), a convivência com esses hospedeiros associada à presença de um vetor competente pode acarretar uma maior ocorrência da doença.

CONCLUSÕES

Este trabalho constitui o primeiro estudo epidemiológico no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, acerca da ocorrência, em cães, de *E. canis* e *Rickettsia* spp. e fatores de risco associados. Nesse estudo foi identificada infecção ativa por *E. canis* no sangue total dos animais testados, refletindo a real situação da EMC no Estado da Paraíba, além de detectar, pela primeira vez, atividade sorológica de *Rickettsia* spp. e, em três amostras, determinar o provável antígeno envolvido na reação homóloga: *R. amblyommii*, *R. felis* e *R. Rickettsii*. Haja vista que o cão pode ser utilizado como importante sentinela em estudos de vigilância epidemiológica dessas doenças, sugere-se a realização de estudos posteriores para melhor entendimento da dinâmica das riquettsioses no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado de TEFER. A Gilvan Mariano do Setor de Informática do CpqAM/FIOCRUZ-PE pela confecção do mapa da Figura 1.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, D.M., Saito, T.B., Hagiwara, M.K., Machado, R.Z. & Labruna, M.B. 2007. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. Cienc. Rural. 37: 796-802.
- Angeloni, V., Keller, R. & Walker, D. 1997. Rickettsial pox-like illness in a traveller. Mil Med. 162:636-639.
- Angerami, R.N., Resende, M. A., Feltrin, A.F.C., Katz, G., Nascimento, E.M., Stucchi, R.S.B. & Silva, L.J. 2006. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil. Ann N Y Acad Sci. 1078:252-254.
- Apperson, C.S., Engber, B., Nicholson, W.L., Mead, D.G., Engel, J., Yabsley, M.J., Dail, K., Johnson, J. & Watson, D.W. 2008. Tick-borne diseases in North Carolina: is *Rickettsia amblyommii* a possible cause of rickettsiosis reported as Rock Mountain spotted fever? Vector Borne Zoonotic Dis. 8:597-606.
- Bacellar, F., Regnery, R.L, Nuncio, M.S. & Filipe, A.R. 1995. Genotypic evaluation of Rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. Epidemiol Inf. 114:169-78.

- Breitschwerdt, E.B., Walker, D.H., Levy, M.G., Burgdorfer, W., Corbett, W.T., Hurlbert, S.A., Stebbins, M.E., Curtis, B.C. & Allen, D.A. 1988. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. *Am J Vet Res.* 49: 70–76.
- Bustamante, M. E. & Varela, G. 1947. Distribución de las rickettsiasis en Mexico. *Rev Inst Salubr Enferm Trop.* 8: 3-14.
- Demma, L.J., Traeger, M.S., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Blau, D.M., Eremeeva, M.E., Dasch, G.A., Levin, M.L., Singleton, J. Jr., Zaki, S.R., Cheek, J.E., Swerdlow, D.L. & McQuiston, J.H. 2005. Rocky mountain spotted-fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.* 353:587–594.
- Dias, E. & Martins, A.V. 1939. Spotted fever in Brazil: a summary. *Am J Trop Med.* 19:103-8.
- Doyle, C.K., Labruna, M.B., Breitschwerdt, E.B., Tang, Y.W., Corsvet, R.E., Hegarty, B.C., Bloch, K.C., Li, P., Walker, D.H. & McBride, J.W. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* spp. by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the *dsb* gene. *J Mol Diagn.* 7:504-510.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G. H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F. R. 2001. 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.* 51:2145-2165.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. 2007. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. J.* 175:212-217.
- Galvão, M.A.M., Silva, L.J., Nascimento, E.M.M., Calic, S.B., Sousa, R. & Bacellar, F. 2005. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Rev. Saúde Públ.* 39:850-856.
- Galvão, M.A.M., Lamounier, J.A., Bonomo, E., Tropa, M.S., Rezende, E.G., Calic, S.B. & Walker, D.H. 2002. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 18:1593-1597.
- Harrus, S. & Waner, T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J.* 187: 292-296.

- Horta, M.C., Labruna, M.B., Sangioni, L.A., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Galvão, M.A., Mafra, C.L., Vidotto, O., Schumaker, T.T. & Walker, D.H. 2004. Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsiae* in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the State of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Am J Trop Med Hyg.* 71:93-97.
- Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. Applied logistic regression. John Wiley & Sons, New York. 375 p.
- Labruna, M.B., Mattar, S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J.M., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., Sousa, R., Oteo, J. & Zavala-Castro, J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. MVZ Córdoba.* 16: 2435–2457.
- Labruna, M.B., Horta, M.C., Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Pinter, A., Gennari, S.M. & Camargo, L.M. 2007. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:249-55.
- Labruna, M.B. 2004. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13:123–124.
- La Scola, B. & Raoult, D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 35: 2715-27
- Labarthe, N., Pereira, M.C., Barbarini, O., Mckee, W., Coimbra C.A. & Hoskins, J. 2003. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. *Vet Ther.* 4:67-75.
- Lakos, A. & Raoult, D. 1999. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) a *Rickettsia slovacica* infection? p. 258-61. In: Raoult, D.A. & Brouqui, P. (Eds), *Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millenium*. Elsevier, Paris.
- Lemos, E.R. Rickettsial diseases in Brazil. 2002. *Virus Rev Res.* 7:7-16.
- Lemos, E.R.S., Machado, R.D., Pires, F.D.A., Machado, S.L., Costa, L.M.C. & Coura, J.R. 1997. Rickettsiae-infected ticks in a endemic area of spotted fever in state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92:477-481.
- Melo, A.L., Martins, T.F., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Pacheco, R.C., Labruna, M.B. & Aguiar, D.M. 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2:213-218.

- Moraes-Filho, J., Pinter, A., Pacheco, R.C., Gutmann, T.B., Barbosa, S.O., Gonzáles, M.A.R.M., Muraro, M.A., Cecílio, S.R.M. & Labruna, M.B. 2009. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9:73-78.
- Moreira, J.A. & Magalhães, O. 1935. Thypho exantematico em Minas Gerais. *Brasil Médico.* 19: 465-470.
- Nicholson, W. L.; Gordon, R.; Demma, L. J. 2006. Spotted fever group rickettsial infection in dogs from eastern Arizona: how long has it been there? *Ann N Y Acad Sci.* 1078:519-522.
- Oliveira, R.P., Galvão, M.A.M., Mafra, C.L., Chamone, C.B., Calic, S.B., Silva, S.U. & Walker, D.H. 2002. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerg Inf Dis.* 8:317-319.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol.* 18:719-56.
- Piranda, E.M., Faccini, J.L., Pinter, A., Saito, T.B, Pacheco, R.C., Hagiwara, M.K. & Labruna, M.B. 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107:696-701.
- Pinter, A., Horta, M.C., Pacheco, R.C., Moraes-Filho, J. & Labruna, M.B. 2008. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica.* 24:247-52.
- Pinter, A. & Labruna, M.B. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 1078:523-529.
- Piranda, E.M., Faccini, J.L.H., Pinter, A., Pacheco, R.C., Cançado, P.H.D. & Labruna, M.B. 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11: 29–36.
- Raoult, D. & Roux, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *CMR.* 10:694-719.
- Saito, T. B., Cunha-Filho, N.A., Pacheco, R.C., Ferreira, F., Pappen, F.G., Farias, N.A.R. Larsson, C.E. & Labruna, M.B. 2008. Canine Infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in Southern Brazil, *Am J Trop Med Hyg.* 79:102-108.

- Souza, B.M.P.S., Leal, D.C., Barboza, D.C.P.M., Uzêda, R.S., De Alcântara, A.C., Ferreira, F., Labruna, M.B., Gondim, L.F.P. & Franke, C.R. 2010. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19: 89-93.
- Spolidório, M.G., Minervino, A.H., Valadas, S.Y., Soares, H.S., Neves, K.A., Labruna, M.B., Ribeiro, M.F. & Gennari, S.M. 2013. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 22:214-219.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Mantovani, E., Brandão, P., Richtzenhain, L.J. & Yoshinari, N.H. 2010. Novel spotted fever group rickettsioses. *Brazil Emerg Infect Dis.* 16:521–523.
- Szabó, M.P., Pinter, A. & Labruna, M.B. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:27, doi: 10.3389/fcimb.2013.00027.
- Tanikawa, A., Labruna, M.B., Costa, A., Aguiar, D.M., Justiniano, S.V., Mendes R.S., Melo, A.L.T., Alves, C.J. & Azevedo, S.S., 2012. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Res Vet Sci.* 94:474-477.
- Vianna, M.C.B. 2002. Pesquisa de infecção por riquetsia do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de carrapatos *Amblyomma cajennense* em uma área endêmica do estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses, Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 67p.
- Vieira, R.F.C., Biondo, A.B., Guimarães, A.M.S., Santos, A.P., Santos, R.P., Dutra, L.H., Diniz, P.P.V.P., Moraes, H.A., Messick, J.B., Labruna, M.B. & Vidotto, O. 2011. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20: 1-12.
- Yoder, J.A., Benoit, J.B., Rellinger, E.J., Tank, J.L., 2006. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Med Vet Entomol.* 20: 365-372.

6. DISCUSSÃO GERAL

Doenças transmitidas por carrapatos são uma importante causa de morbidade e mortalidade em cães de todo o mundo, com o *Rhipicephalus sanguineus* (o carrapato marrom do cão), apontado como vetor de vários agentes causadores de doenças tais como erliquiose, anaplasmose, babesiose, hepatozoonose e febre maculosa (DANTAS-TORRES *et al.*, 2008). Em uma era de zoonoses emergentes pesquisar locais que possuem potencial para desenvolver condições para o aparecimento destas doenças como, presença de carrapatos vetores e seus hospedeiros, e a pesquisa dos agentes responsáveis que circulam numa população são importantes para alcançar o diagnóstico precoce, tratamento e controle, fundamentais para a manutenção do bem estar animal, além de impedir a ocorrência de casos em humanos (GALVÃO *et al.*, 2005).

Nosso trabalho buscou conhecer quais as principais doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e agreste do estado da Paraíba e identificar possíveis fatores de risco associados à ocorrência das mesmas.

Inicialmente buscou-se otimizar a técnica de PCR, a qual já vem sendo utilizada largamente, visando um diagnóstico mais preciso da erliquiose e anaplasmose caninas. O sangue total é utilizado, na maioria dos casos, como fonte de DNA (RAMOS *et al.*, 2009; DAGNONE *et al.*, 2009), mas suas frações ainda não haviam sido testadas. Para tanto, se propôs a avaliação, por meio de nPCR, das frações sanguíneas como alternativa para extração de DNA erliquial. Diante dos resultados, apesar dos agentes infectarem principalmente leucócitos e plaquetas, o sangue total demonstrou ser a melhor fonte de DNA, quando comparado às frações de papa leucocitária, granulócitos, mononucleares e coágulo sanguíneo, muito provavelmente pelo fato de o mesmo albergar tanto bactérias no interior de células hospedeiras como também aquelas livres no plasma, oriundas de lise celular. Além disso, a pesquisa gerou a primeira identificação de *A. platys* em cães no estado da Paraíba.

A escassez de dados no estado da Paraíba acerca da real situação epidemiológica das doenças transmitidas por carrapatos, além da importância dessas na rotina médica veterinária e também humana impulsionou os estudos desenvolvidos nos artigos 2 e 3. Esses mostraram que apenas a espécie de carrapato *R. sanguineus* encontra-se infestando os cães no município de Patos, estado da Paraíba. Considerando que essa espécie é o principal carrapato que parasita cães no Brasil, principalmente em áreas urbanas (LABRUNA, 2004) e que as condições climáticas de baixa disponibilidade de água e umidade, características da região em estudo, favorecem o predomínio da mesma (YODER *et al.*, 2006) *R. sanguineus* provavelmente está relacionado à transmissão de *E.*

canis, *B. canis vogeli* e *Rickettsia* spp., agentes relatados pela primeira vez em cães na região em estudo.

Entre os cães oriundos de rotina médica a presença de *E. canis* foi detectada em 34% dos animais, por RIFI, e 25% por qPCR. Esses valores são superiores aos observados em estudos prévios (CARVALHO *et al.*, 2008; TANIKAWA *et al.*, 2012). Os percentuais mais altos obtidos no nosso trabalho podem estar relacionados à inclusão na pesquisa apenas de animais infestados por carrapatos ou, no caso da qPCR, a uma maior sensibilidade da técnica em relação a PCR convencional. Já em relação aos cães domiciliados a prevalência obtida, pela técnica de qPCR, foi de 8,9% (64/719). Esse valor foi inferior ao observado anteriormente na região Nordeste, considerando os estudos nos estados do Ceará, Pernambuco, Alagoas e Bahia (VIEIRA *et al.*, 2011). Entretanto, esta alta prevalência de *E. canis* na região pode estar superestimada considerando que apenas ferramentas sorológicas, menos precisas, foram utilizadas nas pesquisas.

O fato dos proprietários serem analfabetos ou terem cursado apenas o primeiro grau de ensino, dos cães não serem vacinados e serem submetidos aos regimes de criação solto e semi-domiciliar foram considerados como fatores de risco para erliquiose. No presente estudo além da maior sensibilidade diagnóstica e analítica da técnica de qPCR foi possível se identificar não uma exposição ao agente, mas sim casos de infecção ativa nos quais o DNA erliquial foi detectado a partir de sangue total de cães, o que demonstra a real situação da EMC no estado da Paraíba.

10 animais apresentaram DNA de *B. canis vogeli*, confirmados por sequenciamento, sendo a frequência de animais positivos superior ao observado anteriormente por Ramos *et al.* (2010) na região Nordeste. A idade e a diminuição no número de plaquetas apresentaram correlação significativa com a babesiose.

5,76% das amostras foram positivas, por RIFI, para pelo menos um dos antígenos de *Rickettsia* testados (título ≥ 64). A presença de animais sororeagentes indica a circulação de *Rickettsia* do GFM, em uma determinada área, pelo menos nos últimos 6-18 meses (PIRANDA *et al.*, 2008). O presente trabalho detectou pela primeira vez, evidências sorológicas da ocorrência desse agente em cães no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil e, em três amostras foi possível determinar o provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAERH): *R. amblyommii*, *R. felis* e *R. rickettsii*.

Nenhum animal apresentou DNA de *Hepatozoon* spp. o que foi atribuído à identificação apenas de *R. sanguineus* nos cães em estudo. Essa espécie de carrapato, apesar de considerada como principal vetor de *H. canis* (BANETH *et al.*, 2007) nunca foi identificada no Brasil com infecção experimental ou natural por esse patógeno provavelmente por apresentar diferenças genéticas (FORLANO *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2010; MORAES-FILHO *et al.*, 2011).

Na condição de hospedeiro para carrapatos vetores, o cão pode ser utilizado como importante sentinela em estudos de vigilância epidemiológica e a prevalência de reações sorológicas positivas em cães de uma área geográfica põe em evidência o risco de infecção humana.

A pesquisa desenvolvida além de alertar acerca da ocorrência de agentes transmitidos por carrapatos aos cães, no estado da Paraíba, indica a necessidade da realização de estudos posteriores os quais possam acrescentar maiores detalhes no tocante à epidemiologia desses patógenos, haja vista que os resultados indicam um risco eminente de exposição da população humana e um problema em potencial na manutenção da saúde pública da região em questão.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir das atividades desenvolvidas, as quais deram origem aos três trabalhos aqui apresentados, foi possível destacar o sangue total como melhor fonte de DNA, em relação a suas frações, quando utilizado no diagnóstico de erliquiose e anaplasmose caninas por meio de ferramentas moleculares. Além disso, *E. canis* apresentou-se como o principal agente transmitido por carrapatos aos cães, no estado da Paraíba, com a identificação também de infecções por *B. canis vogeli*, *Rickettsia* spp e *A. platys* os quais podem ser incluídos num possível diagnóstico diferencial da rotina médica veterinária da região. Esse é o primeiro relato da ocorrência desses agentes em cães na região estudada.

Considerou-se como fatores de risco para erliquiose o ato de não vacinar os cães, o animal ser fêmea, o regime de criação semi-domiciliar e solto, e os proprietários serem analfabetos ou terem cursado apenas o primeiro grau. Anemia, leucopenia e trombocitopenia também apresentaram associação significativa com a ocorrência de erliquiose. *B. canis vogeli* foi identificada pela primeira vez na região e uma correlação significativa foi observada entre a diminuição de plaquetas e infecção por esse agente. O contato com gatos e com animais silvestres e o fato do animal ser macho foram considerados fatores risco para a ocorrência de *Rickettsia* spp.

A pesquisa desenvolvida além de alertar acerca da ocorrência de agentes transmitidos por carrapatos aos cães, no estado da Paraíba, indica a necessidade da realização de estudos posteriores os quais possam acrescentar maiores detalhes no tocante à epidemiologia desses patógenos, haja vista que os resultados indicam um risco eminente de exposição da população humana e um problema em potencial na manutenção da saúde pública da região em questão.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAHI, S.U.; SANNUSI, A. Babesiose canina. In: KIRK, R.W. *Atualização Terapêutica Veterinária*. São Paulo: Manole,1998. p.1386-1388.
- ABOGE, G.O.; JIA, H.; TERKAWI, M.A.; GOO, Y.; KURIKI, K.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; SUZUKI, H.; XUAN, X. A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*. v.149, p.85–94, 2007.
- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*. v. 44, p. 126-132, 2007.
- AGUIAR, D.M.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Isolamento e caracterização molecular de um isolado de *Ehrlichia canis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.39, p. 489-493, 2008.
- AGUIAR, D. M.; ORLANDELLI, R. Reatividade cruzada entre diferentes isolados brasileiros de *Ehrlichia canis*. In: III Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária, 2009, Bonito. Anais do III Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária, 2009, 1 CD.
- ALMEIDA, A.P. *Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Leishmania em Cachorro-do-mato (Cerdocyon thous) de vida livre do estado do Espírito Santo*. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado Epidemiologia Experimental Aplicada)-Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L.; LABARTHE, N.V.; O'DWYER, L.H.; SOUZA, A.M.; ALVES, L.C.; SERRÃO, M.L. *Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses*. Rio de Janeiro: L.F.Livros, 2002. 135p.
- ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. *Ciência Animal Brasileira*. v. 6, p. 49-54, 2005.
- ALVES, R. N. *Isolamento, propagação, caracterização genética e mecanismo de evasão de Ehrlichia canis in vitro*. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.2010.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F., Erliquiose canina - revisão. *Clínica Veterinária*. v.4, p. 31-38, 1999.

ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A.; SULZER, A.J. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. *American Journal of Veterinary Research*. v.41, p.2102–2105, 1980.

ANGERAMI, R.N.; RESENDE, M.A.; FELTRIN, A.F.C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E.M.; STUCCHI, R.S.B.; SILVA, L.J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1078, p.252–254, 2006.

APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W.L.; MEAD, D.G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M.J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D.W. Tick-borne diseases in North Carolina: is *Rickettsia amblyommii* a possible cause of rickettsiosis reported as Rock Mountain spotted fever? *Vector Borne and Zoonotic Disease*. v.8, p.597–606, 2008.

BANETH, G.; SHKAP, V.; PRESENTEY, B.Z.; PIPANO, E. *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Veterinary Research Communications*. v. 20, p. 41-46, 1996.

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 11, p. 365-370, 1997.

BANETH, G.; SHKAP, V.; SAMISH, M.; PIPANO, E.; SAVITSKY, I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. v. 74, p. 299-305, 1998.

BANETH, G.; BARTA, J.R.; SHKAP, V.; MARTIN, D.S.; MACINTIRE, D.K.; VINCENT-JOHNSON, N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *Journal of Clinical Microbiology*. v.38, p.1298-1301, 2000.

BANETH, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; AROCH, I.; SHKAP, V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology*. v.87, p.606 – 611, 2001.

BANETH, G.; MATHEW, J.S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D.K.; BARTA, J.R.; EWING, S.A. Canine Hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology*. v.19, p.27–31, 2003.

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *The Journal of Parasitology*. v.93, p.283-299, 2007.

BARTA, J. R. Phylogenetic analysis of the class Sporozoea (phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. *The Journal of Parasitology*. v. 75, p. 195-206, 1989.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.10, p.271–274, 1996.

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

BEALL, M.J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M.D.; CYR, K.E.; DINIZ, P.P.; MAINVILLE, C.; HEGARTY, B.C.; CRAWFORD, J.M.; BREITSCHWERDT, E.B. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. v. 8, p. 455-464, 2008.

BECK, R.; VOJTA, L.; MRLJAK, V.; MARINCULIĆ, A.; BECK, A.; ZIVICNJAK, T.; CACCIÒ, S.M. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*. v.39, p.843–848, 2009.

BIBERSTEIN, E.L.; HIRSH, D.C. Agentes Rickettsiais de doenças animais; as Riquetsias. In: HIRSH, D.C. & ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-275.

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. *Journal of Clinical Microbiology*. v.41, p.4172-4177, 2003.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.18, p.494-498, 2004.

BÖHM, M.; LEISEWITZ, A.L.; THOMPSON, P.N.; SCHOEMAN, J.P. Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology*. v.141, p.18-29, 2006.

BOTELHO-NEVERS, E.; SOCOLOVSKI, C.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Treatment of *Rickettsia* spp. infections: a review. *Expert review of anti-infective therapy*.v.10, p.1425–1437, 2012.

BRANDÃO, L.P.; HAGIWARA, M.K. Babesiose canina: revisão. *Clínica Veterinária*. v. 41, p. 50-59, 2002.

BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H.; LEVY, M.G.; BURGENDORFER, W.; CORBETT, W.T.; HURLBERT, S.A.; STEBBINS, M.E.; CURTIS, B.C.; ALLEN, D.A. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. *American Journal of Veterinary Research*. v. 49, p. 70–76, 1988.

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

BREMER, W.G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*. v. 131, p. 95-105, 2005.

BULLA, C., TAKAHIRA, R.K., ARAÚJO JR., JP, 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. *Veterinary Research*. v.35, p.141–146, 2004.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. In: WALKER, D. H. (Ed.). *Biology of Rickettsial Diseases*, Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 33-50.

BUSTAMANTE, M.E.; VARELA, G. Distribución de las rickettsiasis en Mexico. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. v.8, p.3-14, 1947.

CADMAN, H.F.; KELLY, P.J.; MATTHEWMAN, L.A.; ZHOU, R.; MASON, P.R. Comparison of The Dot-Blot- Enzyme Linked-Immunoassay With Immunofluorescence for Detecting Antibodies to *Ehrlichia Canis*. *Veterinary Record*. v.135, p.362, 1994.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; CHAMONE, C. B. Inquérito sorológico para febre maculosa em Belo Horizonte, Minas Gerais no ano de 1997. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 34., 1998, Manaus. *Anais...* Manaus, 1998, p. 34.

CÁRDENAS, A. M.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTVET, R. E.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. v. 14, p. 123–128, 2007.

CARDOSO, L.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; RODRIGUES, F.T.; COSTA, A.; MACHADO, J.; DIZ-LOPES, D.; BANETH, G. Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*. v.3, p.27, 2010.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, É.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of three subspecies by restriction fragment length polymorphism analysis on

amplified small subunit ribosomal RNA genes. *The Journal of eukaryotic microbiology*. v.46, p.298-303, 1999.

CHANDRASHEKAR, R.; MAINVILLE, C.A.; BEALL, M.J.; O'CONNOR, T.; EBERTS, M.D.; ALLEMAN, A.R.; GAUNT, S.D.; BREITSCHWERDT, E.B. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. v.7, p.1443-1450, 2010.

CHEN, L.F.; SEXTON, D.J. What's new in Rocky Mountain spotted fever? *Infectious disease clinics of North America*. v.22, p.415-432, 2008.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. v.33, p. 863-884, 2003.

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

CHRISTOPHERS, S.R. The sexual life cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. *Scientific Memoirs by the Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India*. v.28, p. 1-11, 1907.

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

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

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

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

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Systematic and Applied Acarology*. v.14, p. 30-46, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L.A.; MELO, M.F.; DA SILVA, F.J.; DA SILVA, A.L.; ALMEIDA, E.L.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 170, p. 313-317, 2010.

DAVOUST, B.; MEDIANNIKOV, O.; CHENE, J.; MASSOT, R.; TINE, R.; DIARRA, M.; DEMONCHEAUX, J.P.; SCANDOLA, P.; BEUGNET, F.; CHABANNE, L. Study of ehrlichiosis in kennel dogs under treatment and prevention during seven months in Dakar (Senegal). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. v.36, p.613-617, 2013.

DAWSON, J.E.; CANDAL, F.; GEORGE, V.G.; ADES, E.W. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*.v.61, p.293–296, 1993.

DE TOMMASI, A.S.; GIANNELLI, A.; DE CAPRARIIS, D.; RAMOS, R.A.; DI PAOLA, G.; CRESCENZO, G.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; OTRANTO, D. Failure of imidocarb dipropionate and toltrazuril/emodepside plus clindamycin in treating *Hepatozoon canis* infection. *Veterinary Parasitology*. v.200, p.242-245, 2014.

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. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.2, p. 37-40, 1993.

DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil: a summary. *American Journal of Tropical Medicine*. v.19, p.103-108, 1939.

DINIZ, P.P.V.P.; BEALL, M.J.; OMARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.A.; CYR, K.E.; KOTERSKI, J.F.; ROBBINS, R.G.; LALO, P.G.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in Northeastern Arizona. *Vector Borne Zoonotic Disease*. v.10, p.117-23, 2010.

DO CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*. v. 2, p. 29-31, 2007.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSVET, R.E., HEGARTY, B.C., BLOCH, K.C., LI, P., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* spp. by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the dsb gene. *Journal of Molecular Diagnostics*. v. 7, p.504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMONSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. v.5, p.113–119, 2007.

FIGUEIREDO, L.T.M.; BADRA, S.J.; PEREIRA, L.E.; SZABÓ, M.P.J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 32, p.613-619, 1999.

FOGLIA, M.V.; CAPIELLO, S.; OLIVA, G. Tick-transmitted diseases in dogs: clinicopathological findings. *Parassitologia*. v.48, p.135–136, 2006.

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

FORTES, F.S.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Febre Maculosa Brasileira em Cães. *Ciências Agrárias*. v. 32, p. 339-354, 2011.

FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia (*Ehrlichia platys* Infection in Dogs). In *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. New York: Pergamon Press, 1993. p195-208.

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*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.13, p. 231, 2004.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*. v. 175, p. 212-217, 2008.

GALVÃO, M. A. *Febre maculosa Brasileira em Minas Gerais e seus determinantes*. 1988.186f. Dissertação. (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GALVÃO, M.A.; SILVA, L.J.; NASCIMENTO, E.M.; CALIC, S.B.; SOUSA, RD.; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. *Revista de Saúde Pública*. v.39, p.850-856, 2005.

GARRIS, G.I. Control of ticks. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. v. 21, p.173–183, 1991.

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

GAUNT, S.D.; BEALL, M.J.; STILLMAN, B.A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites and vectors*. v.3, p.33, 2010.

GOMES, P.V. MUNDIM, M.J.; MUNDIM, A.V.; DE ÁVILA, D.F.; GUIMARÃES, E.C.; CURY, M.C. Occurrence of *Hepatozoon sp.* in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 174, p. 155-161, 2010.

GONÇALVES, L.R.; FILGUEIRA, K.D.; AHID, S.M.; PEREIRA, J.S.; VALE, A.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.23, p.407-412, 2014.

GONÇALVES, L.R.; FILGUEIRA, K.D.; AHID, S.M.; PEREIRA, J.S.; VALE, A.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.23, p.407-412, 2014.

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

GONEN, L.; STRAUSS-AYALI, D.; SHKAP, V.; VINCENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D.K.; BANETH, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Veterinary Parasitology*. v. 122, p. 131-139, 2004.

GOO, Y.; JIA, H.; ABOGE, G.O.; TERKAWI, M.A.; KURIKI, K.; NAKAMURA, C.; KUMAGAI, A.; ZHOU, J.; LEE, E.G.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. *Babesia gibsoni*: serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. *Experimental Parasitology*. v.118, p.555–560, 2008.

GORDON, J. C.; GORDON, S. W.; PETERSON, E.; PHILIP, R. N. Epidemiology of Rocky Mountain spotted fever in Ohio, 1981: serologic evaluation of canines and rickettsial isolation from ticks associated with human case exposure sites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 33, p. 1026-1031, 1984.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. v. 14, p. 3-18, 2008.

GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006.v. 3.

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

HARRUS, S.; AROCH, L.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *The Veterinary Record*. v.141, p.2247-2250, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Canine Monocytic Ehrlichiosis - Recent Advances. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 37, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*. v. 86, p. 361-368, 2002.

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

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

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

HOLM LP, KERR MG, TREES AJ, MCGARRY JW, MUNRO ER, SHAW SE. Fatal babesiosis in an untravelled British dog. *The Veterinary Record*. v.159, p.179–180, 2006.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. v. 9, p. 109-118, 2009.

HUNTER J.S., BAGGOTT D., EVERETT W.R., FOURIE J.J., CRAMER L.G., YOONE S.S., COLLIDORF N., MALLOUKF Y., LEE L., BLAIR J., PRULLAGE J.B. Efficacy of a novel topical combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of induced infestations of brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. *Veterinary Parasitology*. v.179, p.318-323, 2011.

INOKUMA, N. D. G.; OHNO, K.; YAMAMOTO, S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v.61, p. 1153-1155, 1999.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 32, p. 1658-63, 1994.

IRWIN, P.J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasite & Vectors*. v.2, doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4, 2009.

IRWIN, P.J. Canine babesiosis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. v.40, p.1141-1156, 2010.

IRWIN, P.J.; HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Australian Veterinary Journal*. v.68, p.204–209, 1991.

IRWIN, P.J.; JEFFERIES, R. Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. *Trends in Parasitology*. v.20, p.27–34, 2004.

IZZI, S.A.; MARTIN, D.S.; CHAN, R.Y.; LEUTENEGGER, C.M. *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infection in a dog. *Veterinary clinical pathology*. v.42, p.471-475, 2013.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; JARDINE, J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J. *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Experimental Parasitology*. v.117, p.115-123, 2007.

KARAGENC, T.I.; PASA, S.; KIRLI, G.; HOSGOR, M.; BILGIC, H.B.; OZON, Y.H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean Coast of Turkey. *Veterinary Parasitology*. v. 135, p. 113-119, 2006.

KIDD, L.; MAGGI, R.; DINIZ, P. P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. *Veterinary Microbiology*. v. 129, p. 294-303, 2008.

KREFT, A.; SKRZYPEK, H.; KAZIMIERCZAK, W. Entomopatogeniczne niczenie w ochronie roślin przed szkodnikami glebowymi. In: *Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce*. (Eds. I. Skrzecz, I.Sierpińska). Instytut Badawczy Leśnictwa (Forest Research Institute), 2012. p. 270-278.

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

LABRUNA, M.B. Cultivo celular de riquetsias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: CBPV, p. 132-133, 2006.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.; 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. *Veterinary Parasitology*. v.143, p.189-195, 2007a.

LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne of Zoonotic Disease*. v.7, p.249-255, 2007b.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 15, p. 458-460, 2009.

LABRUNA, M.B. & VENZAL, J.M. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitologica*. v.54, p.355-363, 2009.

LABRUNA, M.B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J.M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J.. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*. v.16, p.2435–2457, 2011.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. v.35, p.2715-2727, 1997.

LASTA, C.S.; SANTOS, A.P.; MELLO, F.P.S.; LACERDA, L.A.; MESSICK, J.B.; GONZÁLEZ, F.H.D. Infecção por *Hepatozoon canis* em canino doméstico na região Sul do Brasil confirmada por técnicas moleculares. *Ciência Rural*. v.39, p.2135-2140, 2009.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R. Rocky Mountain spotted fever in an endemic área in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 89, p. 497-501, 1994.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 38, p. 427-430, 1996.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; PIRES, F.D.A.; MACHADO, S.L.; COSTA, L.M.C. & COURA, J.R. Rickettsiae-infected ticks in a endemic area of spotted fever in state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.92, p.477-481, 1997.

LEMOS, E. R. S.; ALVARENGA, F. B. F.; CINTRA, M. L.; RAMOS, M. C.; PADDOCK, C. D.; FEREBEE, T. L.; ZAKI, S. R.; FERREIRA, F. C. C.; RAVAGNANI, R. C.; MACHADO, R. D.; GUIMARÃES, M. A. A. M.; COURA, J. R. Spotted fever in Brazil: A seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 65, p. 329-334, 2001.

LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; MONCOL, D.J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. *American journal of veterinary research*. v.48, p.339–41, 1987.

LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L.; LOPEZ-REBOLLAR, L.M.; DE WAAL, D.T. Isolation of South African specific strain of *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*. v. 63, p. 9-16, 1996.

LOVERING, S.L.; PIERCE, K.R.; ADAMS, L.G. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*. v.41, p.1266–1271, 1980.

MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13, supl. 1, p. 53-57, 2004.

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. *Veterinary Clinical Pathology*. v.34, p.44-48, 2005.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever *Rickettsia* in blood culture. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. v.40, p.197-199, 1989.

MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.; WALKER, D.H.; Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infection and Immunity*. v.71, p.2516–2524, 2003.

MCDADE, J.E. Ehrlichiosis a disease of animals and humans. *Journal of Infectious Diseases*. v.161, p. 609-617, 1990.

MAGNARELLI, L.A.; LITWIN, H.J.; HOLLAND, C.J.; ANDERSON, J.F.; RISTIC, M. Canine ehrlichiosis in Connecticut. *Journal of Clinical Microbiology*. v.28, p.366–367, 1990.

MAKIMURA, S.; KINJO, H. Cytochemical identification of canine circulating leucocytes parasitized by the gametocyte of *Hepatozoon canis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v. 53, p. 963-965, 1991.

MARCHETTI, V.; LUBAS, G.; BANETH, G.; MODENATO, M.; MANCIANTI, F. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. *Veterinary Clinical Pathology*. v. 38, p. 121-125, 2009.

MASSARD, C.A. *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) de cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. 1979. 121f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 1979.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of clinical microbiology*. v.36, p.1090-1095,1998.

MATSUU, A.; ONO, S.; IKADAI, H.; UCHIDE, T.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OKANAO, S.; HIGUCHI, S. Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.17, p.569-573, 2005.

McDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annual Review of Microbiology*. v. 40, p. 287-309, 1986.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; SILVA, M. V. Febre maculosa: isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 34, p. 37-41, 1992.

MELO, A.L.; MARTINS, T.F.; HORTA, M.C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks and Tick- Borne Disease*. v.2, p.213-218, 2011.

MITCHELL, E.B.; MCCALL, J.W.; CHESTER, S.T.; LARSEN, D. Efficacy of afoxolaner against *Ixodes scapularis* ticks in dogs. *Veterinary Parasitology*. v.201, p. 223-225, 2014.

MORAES, P.H.; RUFINO, C.P.; REIS, T.; AGUIAR, D.C.; MENESES, A.M.; GONÇALVES, E.C. Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.23, p.105-108, 2014.

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

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; GUTMANN, T.B.; BARBOSA, S.O.; GONZÁLES, M.A.R.M.; MURARO, M.A.; CECÍLIO, S.R.M.; LABRUNA, M.B. New epidemiological data on brazilian spotted fever in an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Disease*. v.9, p.73-78, 2009.

MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Thypho exantematico em Minas Gerais. *Brasil Médico*. v.19, p.465-470, 1935.

MUNDIM, E. C. S.; FRANCISCO, M. M. S.; SOUZA, J. N.; ALENCAR, M. A. G.; RAMALHO, P. C. D. Incidência de hemoparasitos em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis – GO. *Ensaio e Ciência: Ciências biológicas Agrárias e da Saúde*. v. 12, p. 107-115, 2008a.

MUNDIM, A.V.; DE MORAIS, I.A.; TAVARES, M.; CURY, M.C.; SANTOS MUNDIM, M.J. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 153, p. 318, 2008b.

MURATA, T.; SHIRAMIZU, K.; HARA, Y.; INOUE, M.; SHIMODA, K.; NAKAMA, S. First Case of *Hepatozoon Canis* Infection of a dog in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*. v.53, p.1097-1099, 1991.

MURATA, T.; INOUE, M.; KANOE, M.; KONO, Y.; ISHIDA, M.; HORIO, M.; SHIMADA, M.; YOKOYAMA, M.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Ultrastructure and cytochemical characteristics of leukocyte infected with *Hepatozoon canis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v. 55, p. 1043-1045,1993.

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. *Veterinary Parasitology*. v. 79, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*. v.91, p.197-204, 2003.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B.; C.; BILLINIS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v. 40, p. 174–184, 2004.

MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.; GONEN, L.; BILLINIS, C.; KOUTINAS, A.F.; BANETH, G. Anti- *Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. v. 129, p. 229-233, 2005.

NASCIMENTO, E.M.M. *Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, a partir de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) e espécimes biológicos humanos, procedentes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo*. 2003. 70f. Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares. *Ciência Rural*. v. 38, p. 766-770, 2008.

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

NELSON, R. W.; COUTO, C.G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1084 p.

NICHOLSON, W.L.; GORDON, R.; DEMMA, L. J. Spotted fever group rickettsial infection in dogs from eastern Arizona: how long has it been there? *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1078, p.519-522, 2006.

O'CONNOR, T.P.; HANSCOM, J.L.; HEGARTY, B.C.; GROAT, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *American Journal of Veterinary Research*. v. 67, p. 206-210, 2006.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; PEREIRA DE SOUZA, J. C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 94, p. 143-150, 2001.

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

O'DWYER. Brazilian canine hepatozoonosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.20, p.181-193, 2011.

OLIVEIRA, P.R.; BEDZARA, G.H.; DENARDI, S.E.; PIZANO, M.A.; MATHIAS, M.I.I.C. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC (50). *Experimental Parasitology*. v.127, p.418-422, 2011.

OSTFELD, R.S.; PRICE, A.; HORNBOSTEL, V.L.; BENJAMIN, M.A.; KEESING, F. Controlling ticks and tick borne zoonoses with biological and chemical agents. *BioScience*. v. 56, p.383-394. 2006.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends in Parasitology*. v.25, p. 228-35, 2009.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S.; LATROFA, M.S.; STANNECK, D.; DECAPRARIIS, D.; CAPELLI, G.; BANETH, G. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites and Vectors*. v. 4, p. 55-60, 2011.

OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. 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. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v.12, p.1343-1346, 2005.

PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. v.16, p. 37-64, 2003.

PAIVA DINIZ, P.P.; SCHWARTZ, D.S.; MORAIS, H.S.; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. v.7, p.689-697, 2007.

PALUDO, G.R.; DELL'PORTO, A.; TRINDADE, A.R.C.; MCMANUS, C.M.; FRIEDMAN, H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.118, p.243-248, 2003.

PALUDO, G.R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A.; MACINTIRE, D.K.; WHITLEY, E.M.; BOUDREAUX, M.K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B.L.; DYKSTRA, C.C. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. *Parasitology Research*. v. 97, p.167-170, 2005.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; MATHEW, J.S.; CUMMINGS, C.A.; KOCAN, A.A.; BRESHEARS, M.A.; FOX, J.C. Observations on tissue stages of *Hepatozoon americanum* in 19 naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. v.78, p.265-276, 1998.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Journal of Clinical Microbiology*. v.18, p.719-56, 2005.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. *Current Infectious Disease Reports*. v. 11, p. 40-50, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M.B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M.Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. v.4, p. 657-702, 2013.

PASA, S.; VOYVODA, H.; KARAGENC, T.; ATASOY, A.; GAZYAGCI, S. Failure of combination therapy with imidorcarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection. *Parasitology Research*. v.109, p.919-926, 2011.

PASSOS, L.M.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M.. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.127, p.81-85, 2005.

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

PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 24, p. 247-252, 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 107, p. 696-701, 2008.

RAMOS, C.A.N., RAMOS, R.A.N., ARAÚJO, F.R., GUEDES JR, D.S., SOUZA, I.I.F., ONO, T.M. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 18, p.58-62, 2009.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitology Research*. v.107, p.1115-1120, 2010.

RAOULT, D.; PAROLA, P. *Rickettsial diseases*. New York London: CRC Press, 2007. 379p.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C. D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *American Society for Microbiology*. v. 18, p. 719-756, 2005.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; SANTOS J.S.; MARTINS J.R.S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*. v.201, p.128-136, 2014.

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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.42, p.511-517, 1990.

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

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis and its application for the rickettsiae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.47, p.252-261, 1997.

RUBINI, A. S.; DOS SANTOS, P. K.; CAVALCANTE, G.G.; RIBOLLA, P.E.; O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitology Research*. v. 97, p. 91-93, 2005.

RUBINI, A.S.; DOS SANTOS, P.K.; VON AH, L.V.; O'DWYER, L.H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitology Research*. v. 102, p. 895-899, 2008.

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B.; O'DWYER, L.H. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. v.164, p. 324-327, 2009.

RUDOLER, N.; BANETH, G.; EYAL, O.; VAN STRATEN, M.; HARRUS, S. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*.v.31, p.226-233, 2012.

SAITO, T.B., CUNHA-FILHO, N.A., PACHECO, R.C., FERREIRA, F., PAPPEN, F.G., FARIAS, N.A.R., LARSSON, C.E., LABRUNA, M.B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. *The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene*. v.79, p.102-108. 2008.

SALGADO, F. P. *Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil*. 2006. 58f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.2006.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*. v.129, p.389-403, 2004.

SANTARÉM, V.A. *Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos, e comparação de técnicas para diagnóstico de Ehrlichia canis*. 2003. 127f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 2003.

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

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; GRECO, B.; EYAL, O.; ZAZA, V.; BANETH, G. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Veterinary Parasitology*. v.171, p.194-199, 2010.

SCORPIO, D.G.; WACHTMAN, L.M.; TUNIN, R. S.; BARAT, N.C.; GARYU, J.W.; DUMLER, J.S. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*)

with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. *American Association for Laboratory Animal Science*. v. 47, p. 23-28, 2008.

SEIXAS, R.; ALHO, A.M.; GUERRA, D.; CARVALHO, L.M. Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*. v.13, p.18-36, 2011.

SHKAP, V.; BANETH, G.; PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immune fluorescence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.6, p.121-123, 1994.

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.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. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.15, p.13-16, 2006

SOUZA, C.E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F.A.; HORTA, M.C.; SOUZA, S.S.L.; BORBA, R.C.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Veterinary Parasitology*. v.161, p.116–121, 2009.

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

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI, N.H. Novel spotted fever group rickettsioses. Brazil. *Emerging Infectious Disease*. v.16, p.521–523, 2010.

SPOLIDÓRIO, M.G.; TORRES, M.M.; CAMPOS, W.N.; MELO, A.L.; IGARASHI, M.; AMUDE, A.M.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.20, p. 253-255, 2011.

SPOLIDORIO, M.G.; MINERVINO, A.H.; VALADAS, S.Y.; SOARES, H.S.; NEVES, K.A.; LABRUNA, M.B.; RIBEIRO, M.F.; GENNARI, S.M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.22, p.214-219, 2013.

STICH, R.W.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; NEEDHAM, G.R.; GROVER, D.L.; JITTAPALAPONG, S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, p. 540–546, 2002.

STADES, F. C.; BOEVÉ, M. H.; NEUMANN, W.; WYMAN, M. *Fundamentos em Oftalmologia Veterinária*. São Paulo: Editora Manole, 1999.204p.

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

STOTHARD, D.R.; CLARK, J.B.; FUERST, P.A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *International journal of systematic bacteriology*. v.44, p.798–804, 1994.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, p. 90–93, 2001.

SZABÓ, M.P.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v.3, doi:10.3389/fcimb.2013.00027, 2013.

THEODOROU, K.; MYLONAKIS, M.E.; SIARKOU, V.I.; LEONTIDES, L.; KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K.; KRITSEPI-KONSTANTINOOU, M.; BATZIAS, G.; FLOURAKI, E.; EYAL, O.; KONTOS, V.; HARRUS, S. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. v.68, p.1619-1626, 2013.

TORRES, H.M.; MASSARD, C.L.; FIGUEIREDO, M. J.; FERREIRA, T.; ALMOSNY, R.P. Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. *Revista brasileira de ciência veterinária*. v.9, p.77-82, 2002.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; DE MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*. v.140, p. 223-230, 2006.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia Aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade de esses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. *Memórias Instituto Butantan*. v. 15, p. 73-86, 1942.

TROY, G.C.; VULGAMOTT, J.C.; TURNWALD, G.H. Canine Ehrlichiosis: A Retrospective Study of 30 Naturally Occurring Cases. *Journal of American Animal Hospital Association*. v.16, p.181-187, 1990.

VAN DE MAELE, I.; SAVARY-BATAILLE, K.; GIELEN, I.; DAMINET, S. An unusual form of canine babesiosis. *The Canadian Veterinary Journal*. v.49, p.283–286, 2008.

- VIDOTTO, O.; TRAPP, S.M. Babesiose canina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. v.13, p.58-61, 2004.
- VIEIRA, R.F.C., BIONDO, A.B., GUIMARÃES, A.M.S., SANTOS, A.P., SANTOS, R.P., DUTRA, L.H., DINIZ, P.P.V.P., MORAIS, H.A., MESSICK, J.B., LABRUNA, M.B. & VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.20, p.1-12, 2011.
- VINCENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D.K.; BANETH, G. Canine Hepatozoonosis: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Journal of Parasitology*. v.19, p.51–62, 1997.
- WALKER, D.H.; VALBUENA, G.A.; OLANO, J.P. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.990, p.1–11, 2003.
- WANER, T.; BANETH, G.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. *Hepatozoon canis*: size measurement of the gametocyte using image analysis technology. *Comparative Haematology International*. v. 4, p. 177-179, 1994.
- WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary immunology and immunopathology*. v.48, p.177-182, 1995.
- WANER, T. HARRUS; S. JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*. v. 95, p. 1-15, 2001.
- WEN B, RIKIHISA Y, MOTT JM, GREENE R, KIM HY, 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. *Journal of Clinical Microbiology*. v.35, p.1852-1855, 1997.
- World Health Organization. *Pesticides and their Application for the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance*, 6ed. Geneva:World Health Organization, 2006.114 p.
- ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity in dogs. *Parasitology Research*. v.84, p.544-548, 1998.
- ZHOU, J.; JIA, H.; NISHIKAWA, Y.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen. *Veterinary Parasitology*. v.145, p.16–20, 2007.
- YABSLEY, M.J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON, C.N.; CATTAN, P.F.; CHERRY, N.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B.; O'CONNOR, T.; CHANDRASHEKAR, R.

PATERSON, T.; PEREA, M.L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J.; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W.; Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii* and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*. v.151, p.279-285, 2008.

YAMANE, I.; THOMFORD, J.W.; GARDNER, I.A.; DUBEY, J.P.; LEVY, M.; CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *American journal of veterinary research*. v.54, p.1579–1584, 1993.

9. ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA*

Instruções aos Autores

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Apresentação

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

Política Editorial

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral.

O(s) autor(es) deverá(ão) anexar uma carta, previamente assinada, responsabilizando-se pela originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com mais de uma autoria deverão seguir com uma declaração de concordância de todos os autores, referente à publicação. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes. A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão, sendo este último escrito por especialistas e condicionado a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos assistentes.

Taxa de tramitação:

Da submissão do artigo, será cobrada uma taxa de R\$ 40,00 (quarenta reais) referente ao processo de tramitação, paga através de depósito bancário: Banco do Brasil/ Agência: 0269-0/ Conta Corrente: 28.848-9 (RBPV). O comprovante de pagamento deve ser anexado junto ao artigo no ato da submissão.

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3

revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá os formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário.

O artigo a ser submetido deve passar por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV (http://cbpv.org.br/rbpv/revisoes_traducoes.php). Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês. Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão. Lembramos aos autores, que a RBPV não repassa aos mesmos, os custos de publicação por página dos trabalhos. Não seguindo as exigências do processo de submissão, o trabalho não entrará no processo de avaliação.

Após diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe da revista, fazem as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, assinado por todos os autores, concordando com a submissão e, caso aprovado, a publicação do artigo apenas na RBPV.

Ética

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.

Apresentação dos Manuscritos

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte "Times New Roman", tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 15 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Notas de Pesquisa, o trabalho não deverá exceder 5 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Ao submeter o artigo, anexar o comprovante de depósito, via endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/rbpv>. Os trabalhos aceitos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**. As Notas de Pesquisa obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa

categoria, o artigo submetido deve possuir alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 15 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

“Abstract” e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância

de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras “a”, “b”, “c”, etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

Livros

Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação

Paim e Souza (2011) ou (PAIM & SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de “et al.” e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *PESQUISA VETERINÁRIA* BRASILEIRA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto PV.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

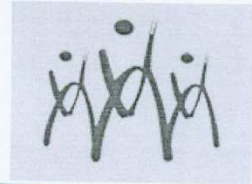
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO UTILIZADO DURANTE A PESQUISA

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO Nº _____ DATA: _____

I DADOS DO PROPRIETÁRIO	
1- Nome:	
2- Endereço:	Cidade:
3- Bairro:	CEP:
4- Telefone:	
5- Grau de escolaridade: () Analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo	
6- Renda familiar: () Menos de 2 salário mínimo () 2 a 4 salários mínimos () 5 a 6 salários mínimos () Mais de 6 salários mínimos	
II DADOS DO ANIMAL	
7- Nome:	
8- Sexo:	() Macho () Fêmea
9- Idade:	() 6 – 12 meses () 12 – 24 meses () 24 – 48 meses () 4 – 6 anos () Acima de 6 anos
10- Raça:	() Sem raça definida () Com raça definida Qual?
III MANEJO	
11- Tipo de criação: () Domiciliar () Semi-domiciliar () Solto	
12- Alimentação : () Ração comercial () Alimento preparado em casa () Ambos Que ração?	
13- Tem contato com outros animais?	() sim () não
14 – Se sim, com quais?	() Equídeos () Silvestres () Felinos () Cães () Suínos
15- Existem outras formas de contato? () Animais em casa () Vizinhos tem animais () O seu animal vai ao petshop () Passeios constantes	
16- Qual o ambiente onde o animal é criado? () Terra () Cimento () Terra/cimento	
17- É realizada limpeza ou desinfecção do local? () Sim () Não	
18- Com que frequência? () Diária () Semanal () Quinzenal () Mensal	
19- O animal tomou alguma vacina? () Sim () Não	
20- Se sim, quais? () Anti-rábica () Contra viroses	
21- O animal já foi vermifugado? () Sim () Não	
22- Se sim, quando?	
23- O animal apresenta ou já apresentou carrapatos? () Sim () Não	
IV EXAME FÍSICO – Aspecto geral do animal	



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética no Uso de Animais
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3057



A: Sr^a. Márcia Almeida de Melo (Coordenadora)

Sr^a. Melo;

Protocolo CEP nº 07-2012

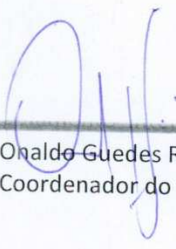
CERTIDÃO

ASSUNTO: Solicitação de aprovação do projeto de pesquisa intitulado “ *Investigação sorológica e molecular da ocorrência de Ehrlichia canis Ehrlichia Chafeensis e Anaplasma platys em cães e carrapatos do HV da UFCG*”.

Cientificamos a V.Sa. que seu projeto teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno desta comissão e foi aprovado em reunião Ordinária nº 02/2012, em 20 de novembro de 2012, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Secretaria da Comissão de Ética o Uso de Animais – CEUA da UFCG.

Patos, 20 de Novembro de 2012.


Onaldo Guedes Rodrigues
Coordenador do CEUA