

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Detecção molecular de *Babesia vogeli* (Piroplasmida: Babesiidae) e *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em carrapatos não ingurgitados coletados em ambiente peri-domiciliar em dois municípios da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro

Roberta Caroline Alvarenga Tolomelli

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia vogeli* (Piroplasmida:
Babesiidae) E *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae)
EM CARRAPATOS NÃO INGURGITADOS COLETADOS EM
AMBIENTE PERI-DOMICILIAR EM DOIS MUNICÍPIOS DA
MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO**

ROBERTA CAROLINE ALVARENGA TOLOMELLI

Sob a orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos
e co-orientação da Dra.
Maristela Peckle Peixoto

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T 647 Tolomelli, Roberta Caroline Alvarenga , 1989-
d Detecção molecular de Babesia vogeli (Piroplasmida:
Babesiidae) e Ehrlichia canis (Rickettsiales:
Anaplasmataceae) em carrapatos não ingurgitados
coletados em ambiente peri-domiciliar em dois
municípios da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro
/ Roberta Caroline Alvarenga Tolomelli. - 2017.
50 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientadora: Maristela Peckle Peixoto.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias, 2017.

1. Rhipicephalus sanguineus sensu lato. 2.
Epidemiologia. 3. Hemoparasitos. 4. Infecção Natural.
5. Carrapato. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-
orient. II. Peixoto, Maristela Peckle , 1986-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ROBERTA CAROLINE ALVARENGA TOLOMELLI

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

Dissertação Aprovada em: 16/08/2017

Huarrisson Azevedo Santos

Huarrisson Azevedo Santos (Dr.) UFRRJ

Claudia Bezerra da Silva

Claudia Bezerra da Silva (Dr.^a) UFRRJ

Nathalie Cunha

Nathalie Costa da Cunha (Dr.^a) UFF

À minha família e ao meu companheiro Charles, que me apoiaram incondicionalmente durante todo meu trajeto.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter me dado forças para seguir nessa caminhada, confesso que tive muitas dificuldades, por vezes não compreendidas por algumas pessoas, mas o importante é que contornei os obstáculos.

Ao meu companheiro Charles Oliveira da Silva, que foi meu maior incentivador e meu maior auxílio, sem sua ajuda eu não teria conseguido. Tenho que agradecer mil vezes por seu amor, sua generosidade e paciência comigo.

À minha querida mãe, Maria Imaculada da Silva, pelo apoio incondicional desde o início da minha graduação até agora.

Ao meu orientador Huarrisson Azevedo Santos por todos os ensinamentos e por toda a paciência. Também agradeço imensamente ao professor Carlos Luiz Massard, sempre presente na minha caminhada.

Ao querido professor Douglas McIntosh pelo grande auxílio, por seus ensinamentos e pela grande paciência.

Agradeço à minha amiga Patrícia Gonzaga Paulino pela grande e maciça ajuda e também pelo apoio incondicional e incentivo.

A toda equipe do Laboratório de Parasitas e Vetores e Laboratório de Sanidade Avícola (LHV/LASAVE/IV-UFRRJ). Em especial à Renata Lins da Costa, Claudia Bezerra da Silva, Maristela Peckle Peixoto, Gabriela Lopes Vivas Vitari, Débora Martins, Thamyris Vilela e Tays Araújo que sempre estiveram dispostas a compartilhar seus conhecimentos. Obrigada também pela amizade durante todo este período.

Ao técnico Josemar César Gonçalves que foi uma pessoa de extrema importância durante minhas coletas. Obrigada por toda boa vontade e paciência. Obrigada também por tornar o LASAVE um laboratório agradável de trabalhar.

À Daniela Coelho pela sua grande amizade, incentivo, ajuda e dias de gordices!

Ao técnico do Departamento de Parasitologia, Maurício Souza Mattos que sempre foi peça presente em todo meu estudo envolvendo a parasitologia veterinária, obrigada pela sua grande amizade e por tornar as coisas mais leves e engraçadas.

Aos meus grandes amigos Thiago Fernandes, Danielle Carlos, Thayara Vianna Raposo e Bárbara R. Senra Passos que estiveram por perto durante todo este tempo. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos valiosos, pelas conversas, pelos cafés da tarde, em sumo: obrigada por serem amigos tão especiais!

Agradeço a todas as pessoas que abriram a porta de suas casas para uma “estranha” procurar carrapatos, vocês também foram peça essencial no meu trabalho, obrigada pela hospitalidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que pela concessão da bolsa durante os anos de Mestrado, me ajudou a desenvolver este projeto.

RESUMO

TOLOMELLI, Roberta Caroline Alvarenga. **Detecção molecular de *Babesia vogeli* (Piroplasmida: Babesiidae) e *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em carrapatos não ingurgitados coletados em ambiente peri-domiciliar em dois municípios da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, 2017.** 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

As babesioses e erliquioses caninas são transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.). Estes hemoparasitos são bem distribuídos no país, sendo a erliquiose mais frequente que babesiose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli* em carrapatos não alimentados coletados em dois municípios da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. Foram analisados 369 carrapatos *R. sanguineus* s.l., incluindo adultos (194), ninfas (92) e larvas (83). As amostras foram submetidas à extração de DNA pelo método de HotSHOT modificado. A detecção molecular de *E. canis* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com alvo no gene “Disulfide oxidoreductase” (*dsb*) de *Ehrlichia* spp., amplificando um fragmento de 409 pares de bases (pb). Para detecção de *Babesia vogeli*, as amostras foram testadas em uma PCR que amplifica um fragmento de 523pb do gene “heat shock protein 70kDa” (*hsp70*) de *B. vogeli*. Foi obtido um total de 41 (11,11%) amostras positivas para *E. canis*, sendo 11 (5,67%) adultos, 8 (8,69%) ninfas e 22 (26,5%) larvas ($p < 0,05$). Em relação a *B. vogeli* foram observadas 24 (6,5%) de amostras positivas, sendo 9 (4,63%) adultos, 7 (7,6%) ninfas e 8 (9,63%) larvas. As análises epidemiológicas demonstraram que a frequência de *B. vogeli* foi maior na zona rural do que urbana ($p < 0,05$), e também em locais onde os cães possuíam abrigos ($P < 0,05$). Concluiu-se que os locais de maior prevalência de *B. vogeli* na região estão contidos mais na zona rural do que urbana e também onde há presença de abrigo para os cães. Na detecção de *E. canis* foi observada maior frequência do hemoparasito em Itaguaí do que Seropédica ($p = 0,01$). O presente estudo demonstrou *E. canis* em larvas de *R. sanguineus* s.l. não alimentadas, reforçando a possibilidade de transmissão transovariana da bactéria, porém, são necessários mais estudos para demonstrar essa forma de transmissão no vetor.

Palavras-Chave: Hemoparasitos, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, carrapato, epidemiologia, infecção natural.

ABSTRACT

TOLOMELLI, Roberta Caroline Alvarenga. **Molecular detection of *Babesia vogeli* (Piroplasmida: Babesiidae) and *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in unfed ticks collected in peridomiciliary environment in two counties of Itaguaí microregion, Rio de Janeiro, 2017.** 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Canine babesiosis and ehrlichiosis are transmitted by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.). These hemoparasites are well distributed in Brazil and the canine ehrlichiosis is more frequent than babesiosis. The aim of this study was to assess the frequency of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in unfed ticks from two counties of Itaguaí microregion, Rio de Janeiro. 369 *R. sanguineus* s.l. ticks were analyzed in peridomiciliary environment, including adults (194), nymphs (92) and larvae (83). The DNA samples were extracted through a HotSHOT modified method. The molecular detection of *E. canis* was made by a PCR that amplifies a 409 bp fragment of Disulfide oxidoreductase (*dsb*) gene of *Ehrlichia* spp. For *B. vogeli* detection, the samples were tested by a PCR that amplifies a 523 bp fragment of heat shock protein 70kDa (*hsp70*) gene. We obtained 41 (11.11%) positive samples for *E. canis*, 11 (5,67%) adults, 8 (8,69%) nymphs and 22 (26,5%) larvae ($p<0.05$). From PCR of *B. vogeli*, we obtained 24 (6,5%) positive samples, 9 (4,63%) adults, 7 (7,6%) nymphs and 8 (9,63%) larvae. The bivariate analysis showed significance for the presence of dog's shelter in relation to *B. vogeli* infection in ticks ($p<0.05$). The area of collection had statistical significance too. It demonstrated that ticks in rural areas are more likely to get infection by *B. vogeli* ($p<0.05$). We concluded that *B. vogeli* is more prevalent in rural areas and areas which the dog lives with shelter. The analysis of *E. canis* samples showed that the hemoparasite is more frequent in Itaguaí city than Seropédica ($p=0,01$). This study has shown the presence of *E. canis* in larvae of *R. sanguineus* s.l.. This event increases the possibility of transovarial transmission of the bacteria, however, more studies are necessary to demonstrate experimentally this kind of transmission in the tick vector.

Keywords: Hemoparasites, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, tick, epidemiology, natural infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trofozoítio de <i>Babesia canis vogeli</i> em hemácia de cão. (Imagem cedida por Patrícia G. Paulino)	6
Figura 2 - Mórula de <i>Ehrlichia canis</i> em leucócito, esfregaço sanguíneo de cão. (Fonte: acervo pessoal)	9
Figura 3 - Armadilha "Climb Up Trap". (Fonte: http://www.insect-interceptor.com/product.html)	14
Figura 4 - Mapa representativo da cidade de Seropédica-RJ. (Fonte: Wikipedia).....	18
Figura 5 - Mapa representativo da cidade de Itaguaí-RJ. (Fonte: Wikipedia)	19
Figura 6 – <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l. em locais de coleta. A: adulto de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. recém passado por ecdise na parede externa de uma casa; B: ninfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. não alimentada, à procura do hospedeiro na parede de um banheiro; C: vários <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. ingurgitados passando pelo processo de ecdise na parede externa de uma casa; D: ninfa ingurgitada de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. pronta para iniciar ecdise no interior de uma residência.	20
Figura 7 – Dois dos locais de coleta da zona rural de Seropédica. A: canil; B: abrigo no exterior de residência.....	21
Figura 8 - Vista ventral de macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.. (Fonte: acervo pessoal)	21
Figura 9 - Vista dorsal de espécimes <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. adultos. A: macho; B: fêmea. (Fonte: acervo pessoal)	22
Figura 10 - Géis de eletroforese de reação de inibição de <i>Ehrlichia</i> sp. Amostras 2, 4, 6, 8, 9: Bullet Blender® + fenol-clorofórmio; 10, 12, 14, 16, 18: Mini Bead Beater® + FC; 19, 21, 23, 25, 27: Pestle + FC; 1c, 3c, 5c, 7c, 9c: Amostras de HotSHOT sem lise mecânica; C+: controle positivo, <i>Ehrlichia canis</i> ; H2OF, H2OD: controles negativos.....	27
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de PCR do fragmento do gene <i>dsb</i> de <i>Ehrlichia</i> sp. Amostras 94 e 97: larvas positivas”. C+: Controles positivos em diluição 1:10, 1:100 e 1:500, nesta mesma ordem no gel. C-: controles negativos.	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Análise descritiva e bivariada das características ambientais em função da frequência de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. positivos através da técnica de PCR com alvo no gene *hsp70* para *Babesia vogeli* em amostras de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro, 2017.. **30**
- Tabela 2** - Percentual de larvas, ninfas e adultos de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l. positivas para *Ehrlichia* sp através da PCR com alvo no gene *dsb* em amostras de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro, 2017..... Erro! Indicador não definido.1
- Tabela 3** - Análise descritiva e bivariada das características ambientais em função da frequência de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. positivos através da técnica de PCR com alvo no gene *dsb* para *Ehrlichia* sp em amostras de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro, 2017..... **34**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato (Latreille, 1806).	5
2.2 <i>Babesia vogeli</i>	6
2.3 <i>Ehrlichia canis</i>	8
2.4 Diagnóstico de <i>Babesia vogeli</i> e <i>Ehrlichia canis</i>	11
2.5 Extração de ácidos nucleicos	13
2.6 Carrapatos no uso de pesquisas moleculares	14
2.6.1 O método de “HotSHOT”: sua aplicação em artrópodes e uso em carrapatos.....	16
3 METODOLOGIA.....	18
3.1 Área de Estudo	18
3.2 Questionário Epidemiológico	19
3.3 Amostragem e Coleta de Amostras	19
3.4 Identificação dos Carrapatos	21
3.5 Extração de DNA Total	22
3.6 Controles Positivos	23
3.7 Reação de PCR para Amplificação de DNA de Carrapatos	23

3.8 Avaliação da presença de inibidores da PCR	23
3.9.1 Reação de PCR para Detecção de Piroplasmida	24
3.9.2 Reação de PCR para Detecção de <i>Babesia vogeli</i>	24
3.10 Reação de PCR para Detecção de <i>Ehrlichia</i> sp.	24
3.11 Purificação de Produtos e Sequenciamento	24
3.12 Análise de Identidade	25
3.13 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Teste de Amostras Submetidas à Extração por HotSHOT	26
4.2 Detecção de <i>Babesia vogeli</i> : Aspectos Epidemiológicos	27
4.3 Detecção de <i>Ehrlichia</i> sp.: Aspectos de Epidemiologia.....	31
4.4 Análise de Identidade	34
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7 ANEXOS..	49

1 INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses em cães possuem grande importância na medicina veterinária, pela possibilidade de causar doença grave e trazer danos irreversíveis, podendo culminar com a morte do animal. No Brasil, *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli* estão entre as doenças transmitidas por vetores mais importantes do país, devido sua distribuição, infectividade e patogenicidade (DANTAS-TORRES, 2008; IRWIN, 2010). As babesioses e erliquioses caninas são transmitidas pelo carrapato vermelho do cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (SHORTT, 1973; BREMER et al., 2005; MONTEIRO, 2011). Sendo assim, o papel do carrapato em estudos direcionados a estes hemoparasitos é muito importante, principalmente em estudos epidemiológicos e da biologia dos mesmos. O carrapato *R. sanguineus* s.l. está distribuído por todo o país e conseqüentemente as doenças transmitidas por eles também possuem larga distribuição. O diagnóstico destas hemoparasitoses é realizado comumente a partir de análises laboratoriais dos elementos do sangue (patologia clínica), através da visualização em citologia dos hemoparasitos no interior de células e também através de exames sorológicos indiretos (GREENE, 2012).

Nos últimos anos as técnicas de biologia molecular evoluíram significativamente, destacando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que vem sendo utilizada com elevada frequência nas pesquisas em parasitologia. O diagnóstico molecular das hemoparasitoses vem se mostrando, em vários estudos, superiores aos métodos diagnósticos tradicionais (BOOZER; MACINTIRE, 2003; OTRANTO et al., 2010; HARRUS; WANER, 2011; SCHOTTHOEFER et al., 2013). Existem grandes vantagens de se utilizar carrapatos em estudos parasitológicos, a começar pela não necessidade de coleta de material biológico de cães, o que torna a metodologia do estudo mais prática e rápida. A quantidade e custo de material necessário para a coleta também é menor do que em coletas de sangue ou tecidos. A utilização de carrapatos não ingurgitados na pesquisa de hemoparasitos é útil para o melhor entendimento da biologia e ciclo dos mesmos, tal como a interação biológica entre parasito e vetor e seus eventos. São raros os estudos que utilizam somente carrapatos não ingurgitados para pesquisa de hemoparasitos, a maioria dos estudos utiliza somente carrapatos coletados em cães ou a junção de carrapatos em fase parasitária e carrapatos de vida livre (AGUIAR et al., 2007b; HARRUS et al., 2010; YBANEZ et al., 2012). O estudo em carrapatos não ingurgitados auxilia principalmente a entender toda a fase de vida do hemoparasito dentro de seu vetor.

Existem muitas técnicas já desenvolvidas para o diagnóstico de hemoparasitoses, porém a maioria é padronizada para DNA proveniente de sangue e/ou tecidos, e geralmente é dispendiosa. Dessa forma, torna-se necessário o empenho na busca de soluções possíveis e baratas no diagnóstico de hemoparasitoses em carrapatos.

No presente estudo objetivou-se realizar a detecção molecular de *E. canis* e *B. vogeli* utilizando um método alternativo e barato de extração de DNA e utilizando PCR convencional em carrapatos não ingurgitados coletados em ambiente peri-domiciliar nos municípios de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro. Objetivou-se também verificar os fatores associados com positividade dos carrapatos através de análise epidemiológica realizada a partir de variáveis ambientais observadas nos locais de coleta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Latreille, 1806)

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), comumente chamado de carrapato vermelho do cão está dentro da classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, família Ixodidae e gênero *Rhipicephalus* (MONTEIRO, 2011). São carrapatos heteroxenos, necessitando de três hospedeiros para completar seu ciclo e são espécie específicos de forma geral, podendo ocasionalmente parasitar outras espécies animais, inclusive o homem (MENTZ et al., 2016) devido a seus hábitos endofílicos. Este ano, Kobayashi e Iwasaki (2017) relataram um caso de um humano idoso com vários carrapatos *R. sanguineus* s.l. dos três estágios fixados no mesmo, uma informação que pode ser preocupante. Apesar dessa característica comportamental da espécie, o carrapato vermelho do cão sobrevive muito bem em ambientes ao ar livre como muros, quintais, paredes e pequenas construções externas de alvenaria ou madeira, sendo encontrados “escondidos” em fendas e frestas destes locais (DANTAS-TORRES, 2010). A duração de seu ciclo pode variar, pois depende diretamente das condições ambientais de temperatura e umidade. Os carrapatos desta espécie, assim como outros, possuem alta capacidade reprodutiva, apesar da fêmea ao longo da vida fazer uma única postura, ela bota de 2.000 a 4.000 ovos viáveis e, seu peso quando ingurgitada tem relação com a quantidade de ovos postos (KOCH, 1982). A duração do repasto sanguíneo também varia muito, de alguns dias até semanas, dependendo do estágio de desenvolvimento do carrapato. É comum os carrapatos se fixarem no hospedeiro e só saírem após estarem totalmente ingurgitados (larvas, ninfas e fêmeas), porém, é comprovado que os machos podem fazer vários repastos sanguíneos em diferentes hospedeiros (LITTLE et al., 2007), o que pode potencializar a dinâmica de transmissão de patógenos dos carrapatos para os cães.

Os carrapatos *R. sanguineus* s.l. estão largamente distribuídos pelo mundo e são encontrados em quase todos os continentes como na Europa (FOURNIER et al., 2003; IRWIN, 2009; CARDOSO et al., 2010; SAINZ et al., 2015), Ásia (INOKUMA et al., 2003; HARRUS et al., 2011; YBAÑEZ et al., 2012; CORALES et al., 2014), África (GHIRBI et al., 2009; KAMANI et al., 2013), Oceania (SPARKES et al., 2014; OSKAM et al., 2017) e América (DANTAS-TORRES, 2008; FRYXELL et al., 2015) sendo a única exceção o continente antártico. A distribuição de *R. sanguineus* s.l. em locais de clima muito frio é incomum, porém, há um relato recente da descrição da espécie na Sibéria Oriental (KHASNATINOV et al., 2016). No Brasil, a espécie é largamente distribuída em todas as regiões do país (LABRUNA et al., 2005; SPOLIDORIO et al., 2011; COSTA-JÚNIOR et al.,

2013; GONÇALVES et al., 2014; WINKEL et al., 2014), isso ocorre devido às condições climáticas do país onde, a umidade relativa é o principal fator favorável para a reprodução do parasito, visto que ele se desenvolve melhor em umidades mais elevadas e em temperaturas acima de 10°C (DANTAS-TORRES et al., 2011). Os carrapatos *R. sanguineus* s.l. possuem grande importância na saúde pública e na medicina veterinária como vetores de agentes patogênicos zoonóticos e não zoonóticos para animais e para o homem.

Existem muitos relatos de identificação de espécies de bactérias do gênero *Rickettsia*, que são importantes agentes patogênicos para o homem (HARRUS et al., 2011). No Brasil já foi identificada *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa, em carrapatos *R. sanguineus* s.l. naturalmente infectados (PACHECO et al., 2011). Também já existe um estudo experimental que demonstra a infecção experimental de *R. rickettsii* por carrapatos *R. sanguineus* s.l., além da ocorrência de transmissão transovariana da bactéria nos carrapatos e a capacidade do mesmo como vetor do patógeno através da transmissão de *R. rickettsii* para porquinhos da Índia (PIRANDA et al., 2011). Além das rickettsioses, também é comprovado o potencial de *R. sanguineus* s.l. transmitir outras bactérias da ordem Rickettsiales de interesse em saúde pública como bactérias do gênero *Anaplasma* e *Ehrlichia* (DAGNONE et al., 2001; SANTOS et al., 2013) onde estão contidos agentes etiológicos de grande importância veterinária que serão citados mais adiante. Nos últimos cinco anos também foi relatada em carrapatos *R. sanguineus* s.l. a presença e posterior identificação através de técnicas moleculares de protozoários causadores de leishmaniose visceral e cutânea no Brasil, respectivamente *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* o que mostra o aumento contínuo da importância de *R. sanguineus* s.l. na saúde pública (MAGNARELLI, 2009; MEDEIROS-SILVA et al., 2015).

Na medicina veterinária os carrapatos *R. sanguineus* s.l. possuem muita importância causando danos diretos como irritação, lesões na pele e até anemia devido sua ação espoliadora. De forma indireta atua na transmissão de agentes patogênicos como *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e também é um vetor em potencial de algumas espécies de *Anaplasma* pois há descrições de *A. platys* e *A. phagocytophilum* encontrados em carrapatos *R. sanguineus* s.l. (GHAFAR; AMER, 2012; MATEI et al., 2016; MELO et al., 2016). Os hemoparasitos como *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., e *Anaplasma* spp. possuem grande importância na medicina veterinária e, no Brasil são responsáveis por uma grande porção das casuísticas encontradas na clínica veterinária de pequenos animais, o que torna importante seu estudo contínuo (NÓBREGA, 2015; OLIVEIRA, 2015).

2.2 *Babesia vogeli*

O gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) está contido na ordem Piroplasmorida, família Babesiidae. São protozoários que parasitam hemácias de animais e do homem dependendo da espécie (Figura 1). Considerando-se suas dimensões de dentro da hemácia, as babésias são divididas em pequenas (menores que 3µm) e grandes (maiores que 3µm) babésias (MONTEIRO, 2011).

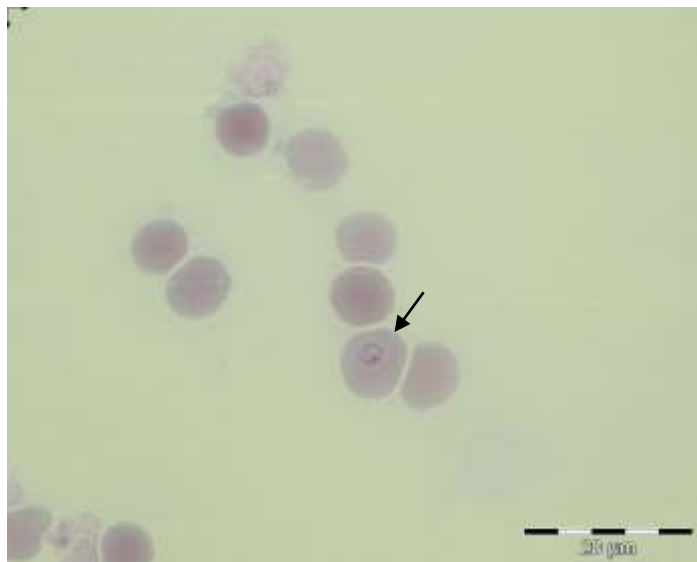


Figura 1 - Trofozoíto de *Babesia vogeli* em hemácia de cão. (Imagem cedida por Patrícia G. Paulino)

Estes protozoários multiplicam-se por divisão binária e após sua multiplicação se apresentam em formato piriforme sendo por este motivo denominados de piroplasmas. Em seu ciclo biológico ocorre reprodução assexuada e sexuada onde: o carrapato ao se alimentar do hospedeiro inocula esporozoítos que em seguida penetram nas hemácias do mesmo e realizam a infecção. Depois disso o esporozoíto passa a sua forma ativa que é chamada trofozoíto, onde este inicia sua reprodução assexuada formando merozoítos. Nisso a hemácia é destruída liberando os merozoítos onde os mesmos penetrarão em novas hemácias e formarão novos merozoítos ou formar gametócitos masculinos e femininos. O carrapato ao se alimentar do hospedeiro ingere juntamente com o sangue os merozoítos e gametócitos. Dentro do sistema digestivo do carrapato somente os gametócitos dão continuidade ao ciclo, formando os gametas masculinos e femininos (gametogonia). Ainda dentro do carrapato os gametas se unem (reprodução sexuada) e formam estruturas móveis denominadas oocinetos que penetram no epitélio digestivo e iniciam divisão assexuada chamada esporogonia, formando esporocinetos. Os esporocinetos atingem vários tecidos do carrapato, onde ocorre a transmissão transovariana e também é através deste mecanismo que ocorre a transmissão transtadial, pois os esporocinetos permanecem nos tecidos do carrapato após a ecdise. A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre quando os esporocinetos migram para a glândula salivar do carrapato e são liberados os esporozoítos para os dutos salivares do mesmo. Assim o carrapato ao se fixar no hospedeiro para se alimentar, libera esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro infectando-o (SHORTT, 1973; MONTEIRO, 2011).

Os protozoários do gênero *Babesia* se distribuem largamente pelo mundo e são encontrados em todos os continentes. De acordo com Irwin (2009) *Babesia vogeli* está distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas enquanto que *Babesia canis canis* está mais distribuída na região da Europa enquanto *Babesia canis rossi* é encontrada mais largamente no continente africano, porém sendo relatada em outros locais e *Babesia gibsoni* é mais encontrada no continente asiático sendo também encontrada na Europa e América (SMITH et al., 2013). No Brasil até o presente momento só há registros de *Babesia canis vogeli* e também há relatos de *Babesia gibsoni* no sul do país (TRAPP et al., 2006; COSTA-JÚNIOR et al., 2012).

Babesia canis é largamente distribuída no Brasil sendo encontrada em todas as regiões brasileiras. Sua frequência de detecção em animais gira em torno de mais ou menos 10%. Estudos realizados em três regiões do país relatam frequências de 11,9%, 6,8% e 8% no sudeste, 7,31% no nordeste e 6,71% em um estudo do centro-oeste (SALGADO, 2006; LEMOS, 2009; O'DWYER et al., 2009; RAMOS et al., 2010; VILELA et al., 2013). Em estudo realizado com animais trombocitopênicos, foi encontrada uma frequência de 16% de *Babesia* spp. (OLIVEIRA, 2015). Costa et al. (2015) demonstraram num estudo, realizado no Maranhão (nordeste do país), que a frequência de *Babesia* spp. é mais alta em testes sorológicos (16,1%) do que em testes moleculares (0,9%), o que pode ser explicado pelo alvo de cada teste diagnóstico. Outro estudo de prevalência feito com métodos imunológicos (RIFI), feito no norte do país, mostrou uma alta frequência do hemoparasito, de 42,6% (SPOLIDORIO et al., 2013). Um estudo sorológico realizado por Vieira et al. (2013) relatou uma frequência de 46,4% para *Babesia canis*, mostrando concordância com o outro estudo sorológico. Esta diferença entre os estudos moleculares e sorológicos pode ocorrer devido à permanência de anticorpos formados pelo animal em infecções passadas, porém os estudos imunológicos não deixam de ressaltar a alta exposição dos cães ao hemoparasito. As frequências de *Babesia* spp. observadas em estudos com carrapatos vão de 1,28% a 4,2% (HARRUS et al., 2010; SMITH et al., 2013; MELO et al., 2016).

A patogenicidade das babesioses tem relação íntima com seu ciclo biológico, depende da estirpe e espécie de *Babesia* que infecta o animal, de infecções concomitantes que possam acomete-lo e de características do próprio animal. A infecção e multiplicação do hemoparasito dentro das hemácias faz com que as hemácias sejam lisadas com a saída dos merozoítos, isso em grande escala causa uma anemia hemolítica no animal. As hemácias ao serem infectadas exibem antígenos em sua superfície de membrana, estimulando produção de anticorpos, opsonização e retirada das mesmas pelo sistema mononuclear fagocitário. A ativação do sistema imune do animal contra a infecção gera uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica. A anemia hemolítica, além da lesão direta das hemácias, pode ser causada por uma anemia hemolítica imunomediada quando há número excessivo de anticorpos se ligando à membrana dos eritrócitos (ADACHI et al., 1995; MONTEIRO, 2011; SOLANO-GALLEGOS; BANETH, 2011; VILELA et al., 2013; SALEM; FARAG, 2014). Nos exames laboratoriais é possível então observar anemia normocítica normocrômica, hemoglobinemias e trombocitopenias, também podendo ser observados monocitose e linfocitose (VILELA et al., 2013; SALEM; FARAG, 2014). Os achados laboratoriais variam muito dependendo da espécie de *Babesia* e da idade da infecção (aguda ou crônica) podendo ser relatados anemia regenerativa ou arregenerativa, leucocitose ou leucopenia, anisocitose, policromasia (MONTEIRO, 2011; SOLANO-GALLEGOS; BANETH, 2011; VILELA et al., 2013; SALEM; FARAG, 2014). Em achados de urinalise podem ser encontrados bilirrubinúria e hemoglobinúria (SOLANO-GALLEGOS; BANETH, 2011).

2.3 Ehrlichia canis

O gênero *Ehrlichia* classifica-se na ordem Rickettsiales e é da família Anaplasmataceae. São bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias e parasitam células hematopoiéticas como plaquetas, monócitos, macrófagos e também linfócitos (ALMOSNY, 1998; MYLONAKIS et al., 2003). A morfologia de *Ehrlichia* sp. é variada, podendo se apresentar como estruturas amorfas de vários tamanhos e granulares (corpúsculos elementares) ou se apresentar na forma de mórulas, com grânulos corados em azul escuro no

método de coloração Giemsa (Figura 2).



Figura 2 - Mórula de *Ehrlichia canis* em leucócito, esfregaço sanguíneo de cão. (Fonte: acervo pessoal)

Ehrlichia canis foi descrita pela primeira vez na Argélia, em 1935 por Donatien e Lestoquard e no Brasil o primeiro relato ocorreu em 1973 em Belo Horizonte. Os hospedeiros das bactérias do gênero *Ehrlichia* dependem da espécie das mesmas, sendo os canídeos os hospedeiros vertebrados de *E. canis*. O principal hospedeiro invertebrado de *E. canis* é o carrapato da espécie *R. sanguineus* s.l., porém, existem estudos mostrando a capacidade vetorial e capacidade hospedeira de outras espécies de carrapatos como *Dermacentor* spp. e *Ixodes* spp., respectivamente (JOHNSON et al., 1998; WIELINGA et al., 2006; MONTEIRO, 2011). *Ehrlichia canis* se multiplica nos hemócitos e glândula salivar dos hospedeiros invertebrados. No cão o ciclo da bactéria tem basicamente três fases principais: penetração dos corpúsculos elementares nos monócitos, multiplicação da mesma originando a formação do corpo inicial e por último a formação das mórulas que é um conjunto de corpos elementares circundados por uma membrana (MONTEIRO, 2011). A transmissão de *E. canis* se dá no momento do repasto sanguíneo de carrapatos infectados em cães saudáveis, também podendo ocorrer transmissão do patógeno através de transfusão sanguínea. A transmissão de *E. canis* entre os carrapatos ocorre entre os estágios dos mesmos (transmissão transtadial), porém não é claramente elucidada a transmissão transovariana (MONTEIRO, 2011). *Ehrlichia canis* além de infectar canídeos, também tem capacidade de infectar humanos, mostrando caráter zoonótico (PEREZ et al., 2006).

Ehrlichia canis é amplamente distribuída pelo mundo, presente em todos os continentes. Estudos de prevalência realizados em vários países demonstram que o continente americano, principalmente na América Central e América do Sul, possuem altas taxas de prevalência se comparadas às outras regiões. Em estudos moleculares realizados no México e na Colômbia a frequência de *E. canis* relatada é de 36% e 40,6%, respectivamente (VARGAS-HERNÁNDEZ et al., 2012; PAT-NAH et al., 2015). Um estudo sorológico realizado por Ghirbi et al. (2009), na Tunísia, relata alta frequência do hemoparasito, de

54,2%. Já em um estudo molecular, realizado na Nigéria, mostra uma frequência de *E. canis* de 12,7% (KAMANI et al., 2013). Estudos realizados em dois países do continente asiático mostram uma baixa frequência do hemoparasito em cães, de 2,0% (Malásia) e 2,85% (Filipinas) (NAZARI et al., 2013; CORALES et al., 2014). Em estudo realizado em três regiões da Itália, Solano-Gallego et al. (2006) demonstraram uma prevalência média de 6,86%, sendo a maior prevalência de 9,7%. *E. canis* também parece estar presente na Austrália (BARKER et al., 2012), porém não foram encontrados dados sólidos de prevalência e detecção molecular nessa região.

No Brasil *E. canis* é distribuída por todo o país. Estudos sorológicos realizados por Aguiar et al. (2007) em cidades do sudeste e nordeste do país, mostraram uma prevalência de 37,9% de *E. canis* em áreas urbanas e 24,8% em áreas rurais. Outro estudo sorológico, feito no estado do Paraná, mostra uma frequência de 44,9% do agente (VIEIRA et al., 2013). Dagnone et al. (2003) em estudo de detecção molecular de *E. canis* em cães atendidos em hospital veterinário no Paraná, demonstraram uma frequência de 21,7%. Pesquisas realizadas no nordeste do país mostraram frequências de 7,8% e 25% (CARVALHO et al., 2008; ROTONDANO et al., 2015). Em estudo feito no sudeste do país com animais atendidos em hospitais veterinários, relatou-se uma frequência de 40,0% (UENO et al., 2009). Outro estudo da mesma natureza e mesma região demonstrou uma frequência de 46,7% em animais trombocitopênicos e 25,4% em animais não trombocitopênicos (SANTOS et al., 2009). No centro-oeste do Brasil, as frequências de *E. canis* observadas são de 15% e 23,3% (WITTER et al., 2013; MELO et al., 2016), sendo maiores em região urbana assim como o estudo de Aguiar et al. (2007) também demonstrou. A frequência de *E. canis* em uma região da Amazônia foi de 16,2% em estudo sorológico realizado (SPOLIDORIO et al., 2013). Os dados de frequência mencionados se tratam de estudos realizados com material biológico de cães.

Existem estudos moleculares onde se utiliza DNA proveniente de carrapatos para determinar frequência de determinados hemoparasitos, sendo alguns desses estudos utilizando ambos materiais para análise (de cão e de carrapato). Estudos realizados na África e na Ásia com carrapatos demonstram frequências de 4,27%, 10,4% e 23,7% (HARRUS et al., 2010; YBAÑEZ et al., 2012; KAMANI et al., 2013). Nos países baixos (Europa) um estudo demonstrou apenas 0,19% de frequência de *E. canis* em carrapatos *Ixodes ricinus* (WIELINGA et al., 2006). No Brasil há variação de frequência de *E. canis* em carrapatos sendo 0,26% em uma região do centro oeste do país, 2,3% no estado de Rondônia, 3,7% e 6,2% no estado de São Paulo (AGUIAR et al., 2007a; MELO et al., 2016).

A patogênese de *E. canis* se dá por mecanismos da bactéria em si e por mecanismos imunológicos. A bactéria adere na célula do hospedeiro e em seguida invade a mesma. Devido à falta de genes envolvidos no metabolismo, o organismo absorve nutrientes do ambiente circundante através de poros e canais em sua superfície de membrana, onde as proteínas p28 e OMP-1 possuem características que permitem a regulação de entrada de nutrientes durante o parasitismo celular. O período de incubação de *E. canis* é de uma a três semanas. O agente se multiplica em macrófagos e monócitos através de fissão binária e se espalha pelo organismo do animal, onde o mesmo infecta outras células provavelmente pela saída e captação através de projeções citoplasmáticas adjacentes. A replicação na célula ocorre em vacúolos isolados ligados à membrana, onde o agente fica protegido do sistema de vigilância imunológica do hospedeiro. *E. canis* pode ser liberada para infectar novas células através de rompimento da membrana da célula hospedeira posteriormente à formação de mórulas. O período de incubação é seguido por três fases da doença: aguda, subclínica e

crônica. A maioria dos cães é tratado e se recupera durante a fase aguda, cães não tratados ou tratados de forma inadequada avançam para a segunda fase da doença, apresentando apenas diminuição na contagem de plaquetas. Após esta etapa, alguns cães avançam para a fase crônica da doença que apresenta como alteração principal uma severa pancitopenia devido hipoplasia de medula. A queda de plaquetas, observada em todas as fases da doença provavelmente se deve ao sequestro das mesmas pelo baço e eliminação imunomediada das mesmas e também por fatores inibidores causados pela infecção (MANOEL, 2010; GREENE, 2012). Os principais achados laboratoriais, como citado acima, são trombocitopenia, anemia e leucopenia, sendo também relatada pancitopenia em casos graves (DAGNONE et al., 2003; UENO et al., 2009; GAUNT et al., 2010; MANOEL, 2010). Os sinais clínicos encontrados são diversos como apatia, hiporexia, letargia, anorexia, linfadenopatia, gastroenterite, alterações hemorrágicas e até alterações pulmonares (UENO et al., 2009; MANOEL, 2010; WITTER et al., 2013). Um estudo experimental por Botelho et al. (2004) relatou mucosas pálidas, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, edema, ascite e glomerulonefrite como achados de necropsia.

2.4 Diagnóstico de *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis*

O diagnóstico de *Ehrlichia spp.* e *Babesia spp.* é geralmente baseado em dados coletados na anamnese e sinais clínicos observados durante exame clínico do animal em conjunto com dados laboratoriais. Existem várias formas de se diagnosticar estes agentes, isso dependerá das condições estruturais da clínica ou laboratório e dos métodos escolhidos para tal. Exames laboratoriais como hemograma, leucograma e exame bioquímico do soro sanguíneo são largamente utilizados no auxílio do diagnóstico, sendo os principais exames a serem confrontados com o estado clínico do animal (GREENE, 2012). O principal, mais prático e mais antigo método utilizado é o método citológico através da confecção de esfregaços sanguíneos para exame em microscópio. Para o diagnóstico de *E. canis*, métodos como citologia de capa leucocitária e de linfonodos podem ser usados como métodos citológicos com boa confiabilidade (MYLONAKIS et al., 2003; GREENE, 2012). Para *B. canis*, além da confecção de esfregaços sanguíneos comuns, também é interessante a confecção de esfregaços com sangue de “ponta de orelha”, pois hemácias parasitadas tendem a se acumular nos capilares (BÖHM et al., 2006; AYOOB; HACKNER; PRITTIE, 2010; GREENE, 2012). Um estudo realizado por Otranto et al. (2010) demonstrou que a utilização de exame citológico de capa leucocitária também é um bom método para diagnóstico de *B. canis* quando em conjunto com método sorológico. Outro estudo apresentou o uso de citometria de fluxo para o diagnóstico de *B. canis*, onde mostrou ser mais eficiente que o exame citológico do sangue e imunofluorescência indireta (BICALHO; RIBEIRO; MARTINS-FILHO, 2004). Também pode ser utilizada uma técnica de exame parasitológico para detecção de *Babesia spp.* onde a pesquisa de hemoparasitos é feita através do exame da hemolinfa do carrapato. Esta técnica consiste na retirada de hemolinfa através de secção da região distal de uma ou duas patas do carrapato, onde é extraída uma pequena quantidade de hemolinfa para realização de um esfregaço em lâmina onde a mesma é corada e posteriormente examinada em microscópio óptico (BARREIRA, 2001). Para ambos os hemoparasitos, o teste sorológico de imunofluorescência indireta é também muito utilizado, o mesmo é considerado o teste sorológico padrão ouro para o diagnóstico de *E. canis*. Além deste também se utiliza “western-immunoblotting” e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), também há vários kits comerciais de “dot-ELISA” ou “point-of-care ELISA

Testing” como o teste Snap 4dX Plus® (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) (O’CONNOR et al., 2006; GREENE, 2012). Os testes sorológicos apesar de muito utilizados, apresentam uma grande desvantagem: a de não serem capazes de identificar infecção recente e de também oferecer resultados falsos positivos visto que muitas vezes o parasito é eliminado do organismo do animal, porém, seus anticorpos formados permanecem (OTRANTO et al., 2010; GREENE, 2012; SCHOTTHOEFER et al., 2013). Mesmo com o frequente uso dos testes laboratoriais (hemograma, leucograma, bioquímica), exames de citologia e testes sorológicos, nenhum se mostra melhor teste confirmatório e/ou diagnóstico do que os testes moleculares como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) (BOOZER; MACINTIRE, 2003; OTRANTO et al., 2010; HARRUS; WANER, 2011; GREENE, 2012; SCHOTTHOEFER et al., 2013).

Durante os últimos 20 anos os avanços em biologia molecular e suas técnicas revolucionaram os estudos em parasitologia veterinária, bem como em outras áreas da pesquisa biológica. Além do aumento de volume de pesquisas, também fora presenciada uma grande evolução nas ferramentas e técnicas moleculares, aumentando cada vez mais a sensibilidade e acurácia das técnicas, sendo impossível imaginar a ciência sem esse artifício tão essencial e inovador (JACOBS; SCHNIEDER, 2006). Em pesquisa na medicina veterinária, as técnicas moleculares tomam conta do cenário e são imensamente utilizadas na pesquisa em parasitologia animal, abrindo caminhos para novas formas de diagnóstico, desenvolvimento de técnicas, descoberta de novas espécies, entre outros. Uma das grandes vantagens das técnicas moleculares, em especial a PCR, é a detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis e também no monitoramento de doenças através da quantificação da infecção e em estudos epidemiológicos. No diagnóstico molecular de parasitas utilizam-se vários materiais para tal, como sangue, tecidos, fezes, urina e também partes ou o todo de ectoparasitos (que são vetores de vários agentes) (LACHAUD et al., 2002; HODGKINSON, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; TORINA et al., 2013; MELO et al., 2016).

Nos estudos de *Ehrlichia spp.* e *Babesia spp.*, o sangue é o principal material utilizado, sendo também utilizados tecidos e carrapatos para pesquisa dos hemoparasitos. Em estudos de PCR realizados com *Babesia spp.* utilizam-se vários marcadores moleculares de diversos genes do protozoário. O primeiro marcador a ser utilizado foi o gene *SSU-rRNA* (KOSTRO et al., 2015). Com o aprofundamento no estudo do genoma do agente, vários outros marcadores moleculares foram propostos para *Babesia spp.* aumentando o leque de opções e possibilidades. Com isso são observados estudos utilizando diversos fragmentos do genes *P29*, *Bc28*, *β -tubulina*, *RAP-1*, *18S* e *hsp70*, sendo que o gene mais observado em número de publicações é o gene *18S* (CACCIÒ et al., 2000; FUKUMOTO et al., 2003; ZHOU et al., 2007; DUARTE et al., 2008; PELEG et al., 2010; CARCY et al., 2015). Dentro dos estudos do gene *18S* são observados estudos específicos, onde se utilizam fragmentos contidos no genoma de uma determinada espécie ou estudos de gênero, onde são selecionados fragmentos que amplificam mais de uma espécie pois o gene possui regiões conservadas e regiões variáveis (DUARTE et al., 2008; HARRUS et al., 2010). Neste trabalho utilizou-se um fragmento que amplifica em várias espécies de *Babesia* (OLMEDA et al., 1997; PELEG et al., 2010). Trabalhos em PCR realizados com *Ehrlichia spp.* também são diversos, sendo que os principais genes alvo para realização dos mesmos são “16S rRNA”, “p28”, “p30”, *dsb*, “VirB9” e “gp19” (AGUIAR et al., 2007b; NAKAGHI, 2008; RUDOLER et al., 2012). Os marcadores moleculares feitos a partir dos genes 16S rRNA e p30 são mais comumente usados (HARRUS; WANER, 2011). No presente estudo foi utilizado um marcador molecular

feito a partir do gene *dsb* que amplifica fragmentos de espécies do gênero *Ehrlichia* (DOYLE et al., 2005).

Estudos em diagnóstico através de PCR possuem muita complexidade, assim como a grande maioria das técnicas em biologia molecular. Sendo assim, um estudo para ser considerado confiável necessita de padronização e otimização gerais, para que um dia o teste/técnica em questão possa ser utilizado em outros laboratórios. Conraths e Schares (2006) falam sobre diagnóstico molecular em laboratórios de parasitologia. Eles destringem a importância da validação de testes, proposta pela OIE. A validação de testes é necessária para estimar até que ponto um resultado de um teste pode desviar-se do estado verdadeiro da amostra testada. Dentro do processo de validação são descritos cinco estágios onde o segundo fala sobre a otimização de reagentes, protocolos e equipamento (OIE, 2004). Sendo assim, a extração de DNA, que é uma das etapas básicas para realização deste processo está ligada a otimização de um teste. Quando o material a ser analisado não sofre uma extração de ácidos nucleicos adequada, pode comprometer os resultados subsequentes.

2.5 Extração de ácidos nucleicos

A obtenção de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas necessita de processos específicos para que ao final dos mesmos se tenha um produto final passível de amplificação na PCR. Há muitos protocolos de extração de ácidos nucleicos que são utilizados, onde se observa muitas diferenças de uso de reagentes, tempo de processamento e quantidade de ácidos nucleicos obtida. Apesar dos diversos protocolos, basicamente se observa três etapas principais na grande maioria das extrações: lise das células, purificação de amostras e precipitação do ácido nucleico (VERLENGIA et al., 2013). Existem no mercado diversos kits de extração comerciais como “DNeasy Blood & Tissue Kit” (QIAGEN, Valencia, California, USA), “Gene JET Genomic DNA Purification Kit” (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), “Tissue & Insect DNA Micro Prep” (Zymo Research, Irvine, California, USA), “Power Soil DNA Isolation Kit” (MoBio, Carlsbad, California, USA), “Qiagen Virus MinElute kit” (Qiagen, Valencia, CA), sendo alguns com finalidade de uso em diversos tecidos e sendo utilizados em carrapatos (CROWDER et al., 2010; AMMAZZALORSO et al., 2015). Também existem protocolos de extração com a utilização de reagente preparados em laboratório como o protocolo de fenol-clorofórmio (SAMBROOK, 2001), hidróxido de amônio e aquecimento (GUY; STANEK, 1991), acetato de potássio (ARMAS; RODRÍGUEZ; BISSET, 2005), hidróxido de sódio e Tris com aquecimento, chamado comumente de “HotSHOT” (TRUETT et al., 2000), entre outros. Durante o processo de extração, a lise celular e liberação do ácido nucleico são realizadas através do uso de detergentes (SDS, Triton x-100, saponina, sulfato de sódio láurico), agentes caotrópicos (tiocianato de guanidina, iodeto de sódio), enzimas (proteínase k, lisozima, nucleases, RNases), agentes quelantes (EDTA), glicose, agentes ácidos e básicos (ácido perclórico, hidróxido de sódio) e também métodos físicos de lise como sonicação e congelamento e descongelamento (VERLENGIA et al., 2013). A purificação da amostra é realizada através de utilização de solventes orgânicos como fenol, clorofórmio, álcool isoamílico e emprego de sais para precipitação salina (chamada de “salting out”). A precipitação dos ácidos nucleicos é uma forma de compactar e isolar as moléculas através da adição de etanol ou isopropanol (VERLENGIA et al., 2013). Esta etapa de purificação e também de precipitação dos ácidos nucleicos pode não ocorrer em alguns protocolos como é o caso do HotSHOT que é um método de lise alcalina modificado, no método de hidróxido de amônio, entre outros

(TRUETT et al., 2000; SANTOLIN, 2014; AMMAZZALORSO et al., 2015).

2.6 Carrapatos no uso de pesquisas moleculares

Os carrapatos ixodídeos tem desempenhado um papel muito importante na pesquisa de protozoários e bactérias patogênicos, pelo fato de serem vetores de muitos deles para os animais e/ou homem. Os mesmos são largamente utilizados na pesquisa de bactérias da ordem Rickettsiales, inclusive *R. sanguineus* s.l. (PACHECO et al., 2011; PIRANDA et al., 2011; FRYXELL et al., 2015). Os carrapatos *R. sanguineus* s.l. são muito utilizados em pesquisas com hemoparasitos como *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Hepatozoon spp.*, e em estudos com outros protozoários e bactérias de importância veterinária e/ou de saúde pública como *Leishmania infantum* por exemplo (BANETH, 2015; MEDEIROS-SILVA et al., 2015).

Em estudos realizados com carrapatos é necessário atentar para diversos passos a serem seguidos, começando pela forma de coleta. A mesma deve ser feita de forma que o artrópode não seja danificado ou morra antes de ser colocado em solução conservadora. A maioria dos estudos com *R. sanguineus* s.l. utilizam coleta manual ou com pinça estética, principalmente em coletas feitas em cães e outros animais (DANTAS-TORRES, 2010). Neste estudo optou-se por utilizar método de coleta manual e com pinça. A utilização de armadilhas utilizando CO₂ também pode ser utilizada para coleta de carrapatos em ambientes domiciliares (NICHOLSON et al., 2006). Um estudo realizado por Carnohan et al., (2015) demonstrou que, o uso de uma armadilha de percevejos hematófagos chamada “ClimbUp Trap” (Figura 3), combinada com CO₂ funciona com sucesso na captura de carrapatos *R. sanguineus* s.l.. O método de “flagging” é mais utilizado para coleta de outras espécies, porém alguns estudos sugerem seu uso na captura de *R. sanguineus* s.l. (NICHOLSON et al., 2006; HARRUS et al., 2010, 2011).

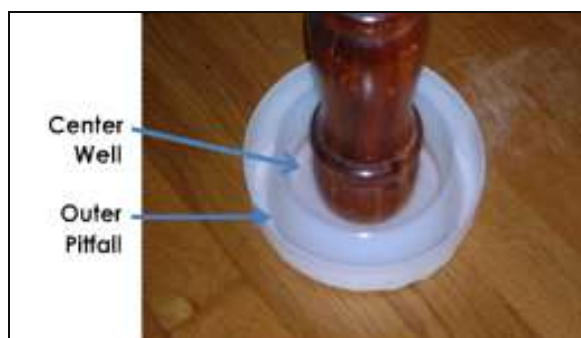


Figura 3 - Armadilha "Climb Up Trap". (Fonte: <http://www.insect-interceptor.com/product.html>)

O local de coleta dos carrapatos (no cão ou ambiente) depende muito do objetivo do estudo e em alguns estudos é indiferente. Durante a coleta os carrapatos, os mesmos são diferenciados devido ao seu estágio de vida, sendo larvas, ninfas ou adultos. Também entre ingurgitados e não ingurgitados, mas essa denominação é subjetiva em alguns estudos. Entende-se por carrapato ingurgitado o carrapato cheio de sangue do hospedeiro (MONTEIRO, 2011). No entanto, carrapatos não ingurgitados podem ser entendidos como carrapatos na fase de vida livre (ambiente) ou simplesmente carrapatos retirados do cão sem estar repleto de sangue. A diferença entre os carrapatos não ingurgitados é importante para o estudo quando se faz pesquisa de transmissão de patógenos entre os estágios de vida

(transestadial) e transmissão para os descendentes (transovariana). É importante definir sobre o estado de alimentação do carrapato, para ter certeza que em um determinado estudo, os carrapatos não possuam sangue do hospedeiro. Pois em alguns estudos de transmissão por exemplo, esta condição é necessária para garantir a veracidade dos mesmos. Estado de ingurgitamento do carrapato também pode ser um fator negativo para PCR, Dharmarajan e Rhodes (2011) demonstraram em um estudo de genotipagem que a inibição na PCR era maior em amostras oriundas de carrapatos ingurgitados quando comparados aos não ingurgitados.

Outro passo a ser seguido é a forma de armazenamento do ixodídeo até extração de material genético do mesmo. A forma mais simples e mais antiga de armazenar o carrapato para sua conservação é guarda-lo em um recipiente com etanol 70%, essa técnica é largamente utilizada para insetos e ainda é utilizada até os dias de hoje por ter eficiência satisfatória (POST et al., 1993; HUBBARD et al., 1995; AMMAZZALORSO et al., 2015). Também é relatada a conservação de carrapatos em uma mistura de soro fetal bovino adicionado de antibióticos (HARRUS et al., 2010). Apesar da maioria dos pesquisadores utilizarem etanol 70% como método de conservação, hoje em dia existe um produto comercial chamado RNAlater® (Ambion, Inc. Austin, Texas) que está provando ser um melhor meio de conservação de artrópodes. Em seu trabalho, Varela (2016) comparou o meio de conservação de RNAlater® frente a dois outros métodos (isopropanol e sais de zinco), demonstrando eficiência de 100% na PCR de carrapatos conservados com RNAlater®, sendo considerado melhor que os outros métodos da comparação para conservação tanto de DNA nuclear, quanto de DNA mitocondrial. Praticamente todas as formas de conservação são aliadas ao congelamento dos parasitos a -20°C ou -80°C. No presente trabalho, optou-se por utilizar RNAlater® como meio conservador e armazenamento a -20°C (freezer).

A extração de ácidos nucleicos é um passo essencial, como dito anteriormente. Na pesquisa com carrapatos utilizam-se vários métodos de extração, comerciais ou não. Independente do método utilizado, a grande maioria deles possui um passo tido como essencial que é a destruição do exoesqueleto quitinoso para liberação do conteúdo. Existem vários meios de se fazer lise mecânica no momento pré-extração. Alguns destes são de maior destruição, como os métodos que utilizam maceração com gral e pistilo e também protocolos que incluem "pestle" para maceração (HILL; GUTIERREZ, 2003; RODRÍGUEZ et al., 2014). A lise mecânica através da utilização de "beads" que são pérolas de vidro ou outro material e possuem diversos diâmetros também é bastante utilizada (CROWDER et al., 2010). Alguns autores também se utilizam de "pools" de carrapatos, que são alguns carrapatos oriundos do mesmo local macerados juntos (HUBBARD et al., 1995). Os elementos básicos da extração de DNA de carrapatos são os mesmos para extração de DNA de tecidos e sangue. Os kits comerciais utilizados para carrapatos são diversos, havendo alguns melhores que outros. Recentemente Ammazalorso et al. (2015) realizaram um estudo comparando cinco métodos de extração onde utilizaram quatro kits comerciais e um método utilizando hidróxido de amônio e aquecimento. Os kits comerciais "Gene JET Genomic DNA Purification Kit" (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e "DNeasy Blood & Tissue Kit" (QIAGEN, Valencia, California, USA) mostraram-se eficientes na extração de carrapatos *Ixodes scapularis* não ingurgitados. No mesmo trabalho os autores recomendaram o uso da extração por hidróxido de amônio como uma alternativa mais simples e barata para extração de carrapatos. Dentro da utilização de métodos que não utilizam kits comerciais, outro estudo comparou três métodos não comerciais em carrapatos *R. sanguineus* s.l. e *R. microplus* ingurgitados e não ingurgitados, sendo eles: método de fenol-clorofórmio, acetato de potássio e hidróxido de amônio. O método de acetato de potássio foi considerado mais eficiente frente

aos dois métodos utilizados (RODRÍGUEZ et al., 2014). Outro método não comercial ocasionalmente utilizado é o método com o agente caotrópico tiocianato de guanidina e terra de diatomácea (HUBBARD et al., 1995).

2.6.1 O método de “HotSHOT”: sua aplicação em artrópodes e uso em carrapatos

O método de “HotSHOT” (Hidróxido de Sódio e Tris aquecidos) é um método não comercial de lise alcalina onde os reagentes são preparados em laboratório. Consiste em somente dois reagentes, não havendo etapas de purificação e precipitação, apenas de lise. O protocolo é seguido da seguinte forma: no material a ser extraído adiciona-se tampão de lise, formado por 25mM de NaOH (hidróxido de sódio) e 0,2mM EDTA, pH 12,0. Em seguida homogeneiza-se levemente e os tubos contendo a mistura são levados para incubar a 95°C durante 30 minutos, após a incubação os tubos são colocados em gelo numa temperatura de aproximadamente 4°C por cinco minutos. Então os tubos são centrifugados brevemente e após isso é adicionado o tampão de neutralização formada por 40 mM de Tris- HCl, pH 5.0 (TRUETT et al., 2000). Este método foi originalmente utilizado para extrair DNA genômico de ratos utilizando como fonte pedaços de tecidos dos mesmos onde não foi feito nenhum método de lise mecânica no período de pré-extração. O tempo de aquecimento pode ser variável, porém no estudo de Truett et al. (2000) demonstrou-se que o tempo de aquecimento até 30 minutos gerava aumento significativo no DNA extraído e depois disso, permanecia praticamente estável. Sendo assim, na maioria dos protocolos de “HotSHOT” utilizados, o tempo de 30 minutos de aquecimento é considerado suficiente.

A quantidade de capa tampão precisa necessariamente ser numa proporção de 1:1, porém, a quantidade a ser utilizada depende do tamanho do fragmento de tecido utilizado. No estudo acima mencionado, foi utilizado um volume de 75µL para cada tampão e concluíram que o método é eficaz, porém gera um DNA de baixa concentração. Alguns anos depois o método foi testado em ovos de invertebrados marinhos. Neste estudo houve maceração do material antes da extração e o método foi comparado com o “método da resina quelante” (Chelex®), mostrando-se mais eficiente que este. Neste mesmo estudo, assim como o estudo de Truett et al. (2000), afirmou-se que o DNA gerado possui baixas concentrações e que, apesar disso, o método é suficientemente confiável em técnicas de PCR, RFLP, SSCP e sequenciamento (MONTERO-PAU et al., 2008a). Alasaad e colaboradores (2008) utilizaram o método com uma pequena modificação na tentativa de extrair DNA de ácaros do gênero *Sarcoptes*. Os autores também seguiram um protocolo de kit comercial para comparação e ao final demonstraram que não houve diferenças significativas entre o método de HotSHOT e o kit comercial “Nucleo Spin Tissue Kit” (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Também afirmaram a possibilidade de utilizar o método em parasitos pequenos de corpo rígido. Além de ácaros, tecidos de mamíferos e ovos de invertebrados, o método também foi utilizado para extrair o conteúdo de repasto sanguíneo de mosquitos e aparentemente obteve sucesso (ALCAIDE et al., 2009).

A utilização de “HotSHOT” em carrapatos é demonstrada por Santolin (2014), onde a autora utilizou a técnica com modificações, onde utilizou o método de “glass beads” como leve lise mecânica e utilizou um tempo de aquecimento de 45 minutos, um pouco acima do demonstrado por Truett et al. (2000). No estudo foram utilizados carrapatos *Amblyomma* spp. e *Haemaphysalis* sp. não ingurgitados. Na padronização da extração de carrapatos foram utilizadas seis técnicas de extração para serem comparadas entre si (kits comerciais e métodos não comerciais), onde foram demonstrados resultados razoáveis para o método “HotSHOT”.

Em seu estudo, Varela (2016) utilizou o método HotSHOT em comparação com o método de fenol-clorofórmio, utilizando carrapatos não ingurgitados (ninfas e larvas) e utilizando um método de lise mecânica (pestle). Ele concluiu que larvas de *Amblyomma* sp. preservadas por até 30 meses em RNAlater® podem ter seu DNA extraído através de qualquer dos dois métodos. Dados do autor demonstram também que houve amplificação do DNA de ninfas. No presente trabalho, optou-se por utilizar a técnica de HotSHOT sem nenhum método de lise mecânica em carrapatos *R. sanguineus* s.l. em estágios de larva, ninfa e adulto. A não utilização de métodos de lise mecânica tem como vantagem manter a integridade do parasito para fins de revisões morfológicas do mesmo.

3 METODOLOGIA

3.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado em duas cidades do estado do Rio de Janeiro, Seropédica (22° 44' 38" S, 43° 42' 28" W; altitude: 26 metros) (Figura 4) e Itaguaí (22° 51' 7" S, 43° 46' 30" W; altitude: 13 metros) (Figura 5). Estas cidades possuem clima tropical com estação seca no inverno, do tipo Aw, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2006). A média da temperatura máxima anual das duas cidades é 30°C e a média da temperatura mínima anual é 20°C aproximadamente, porém em dias de verão a temperatura pode se elevar bastante, sendo que em Seropédica a média da temperatura máxima absoluta anual é de 41°C. As coletas das amostras foram realizadas entre os meses de abril e julho de 2016. Dentro de cada município optou-se por coletar em residências de diversos bairros, principalmente bairros da periferia da cidade. A escolha dos endereços foi realizada por conveniência, sendo a condicional da escolha da residência a presença de cães. Foram coletados carrapatos de 16 pontos de coleta em Itaguaí e 14 pontos de coleta em Seropédica.



Figura 4 - Mapa representativo da cidade de Seropédica-RJ. (Fonte: Wikipedia)



Figura 5 - Mapa representativo da cidade de Itaguaí-RJ. (Fonte: Wikipedia)

3.2 Questionário Epidemiológico

Um questionário semi-estruturado (Anexo 1) foi aplicado aos proprietários dos cães com questões referentes ao manejo dos cães e variáveis ambientais com o objetivo de identificar fatores associados à presença de *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli* em carrapatos coletados do ambiente peridomiciliar. As perguntas foram organizadas de modo a coletar características do ambiente (zona rural ou urbana, ambiente predominante, controle químico de carrapatos, controle físico, presença ou ausência de abrigo, presença de outros animais domésticos, presença de animais silvestres, presença de gatos), do cão (quantidade de cães).

3.3 Amostragem e Coleta de Amostras

Foram coletados carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), de diversos estágios, sendo indivíduos ingurgitados e não ingurgitados (Figura 6). Todos os espécimes não ingurgitados foram retirados de paredes dos locais e também dos abrigos dos cães (Figura 7). Os carrapatos foram retirados com a ajuda de pinça estética e colocados vivos em tubos falcon vazios e lá permaneceram até a chegada ao laboratório para identificação. No presente estudo 100% dos espécimes de carrapatos utilizados foram os não ingurgitados, para descartar a possibilidade de que a origem do hemoparasito detectado fosse de sangue de cão ingerido pelo carrapato. Sendo assim, todos os carrapatos ingurgitados coletados foram colocados em tubos de vidro, tampados com algodão e colocados em câmara climatizada do tipo “Biochemical Oxygen Demand” (BOD) com condições de temperatura ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($80\% \pm 5\%$) ideais para que ocorresse a ecdise. As teleóginas coletadas foram presas à placas de Petri e também colocadas na BOD para realizarem postura. Os ovos obtidos das teleóginas também foram depositados em BOD até a eclosão das larvas. Após a coleta e identificação, os espécimes foram acondicionados em microtubos de 1,5mL contendo cerca de 300 μL de RNAlater® e colocados em freezer a cerca de -20°C . Os espécimes colocados na BOD também sofriam o mesmo tratamento, porém somente após completar ecdise, e larvas após eclodirem.

O número de carrapatos coletados nos dois municípios estudados foi estimado

utilizando a equação descrita por Sampaio et al. (2002), considerando $n = 1,962 \times P \text{ esp} (1 - P \text{ esp}) / d^2$. Onde: n = tamanho da amostra; $P \text{ esp}$ = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada. Sendo assim tomou-se uma prevalência esperada de 50% por não haver uma prevalência pré-determinada na região. Obteve-se o n amostral mínimo de 384 amostras.

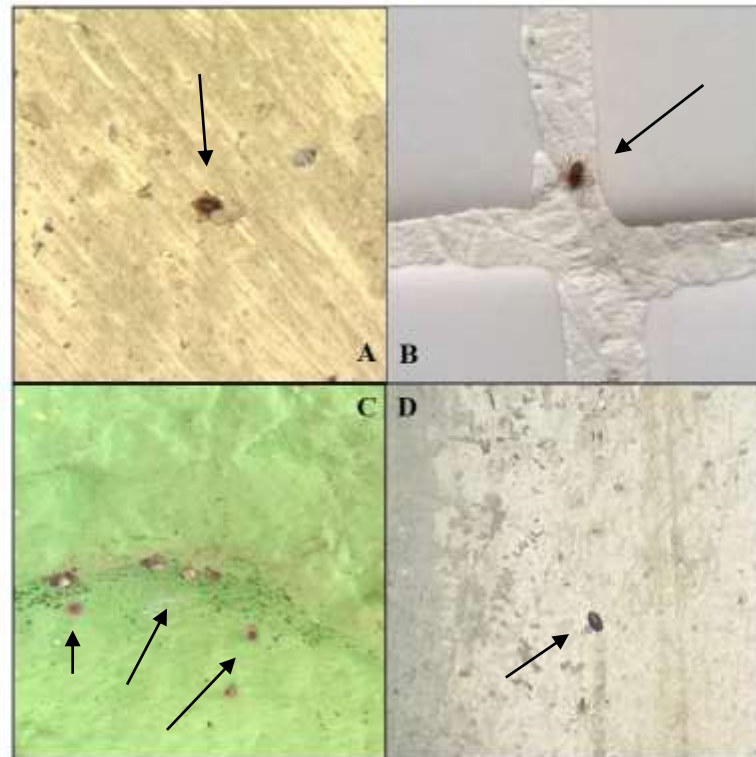


Figura 6 - *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.). em locais de coleta. A: adulto de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. recém eclodido através de ecdise realizada na parede externa de uma casa; B: ninfa de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. não alimentada, à procura do hospedeiro na parede de um banheiro; C: vários *Rhipicephalus sanguineus* s.l. ingurgitados passando pelo processo de ecdise na parede externa de uma casa; D: ninfa ingurgitada de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. pronta para iniciar ecdise no interior de uma residência.



Figura 7 – Dois dos locais de coleta da zona rural de Seropédica. A: canil; B: abrigo no exterior de residência.

3.4 Identificação dos Carrapatos

Os carrapatos adultos foram identificados em estereoscópico através de chaves taxonômicas apropriadas segundo Barros-Battesti (2006). Os estágios imaturos foram identificados com base na chave dicotômica de Clifford et al. (1960). Nas chaves taxonômicas foram consideradas as seguintes características: formato de estigma respiratório, formato da base do capítulo, proporção e tamanho do gnatossoma. A diferenciação sexual foi realizada através da observação de presença ou ausência de um par de placas adanais (Figura 8) e de escudo dorsal completo ou incompleto (Figura 9) (BARROS-BATTESTI, 2006).



Figura 8 - Vista ventral de macho de *Rhipicephalus sanguineus* s.l.. (Fonte: acervo pessoal)



Figura 9 - Vista dorsal de espécimes *Rhipicephalus sanguineus* s.l. adultos. A: macho; B: fêmea. (Fonte: acervo pessoal)

3.5 Extração de DNA Total

Anterior à extração de DNA dos carrapatos, os mesmos foram descongelados, retirados da solução de RNAlater®, colocados em novos microtubos de 1,5mL e submetidos a lavagens sucessivas em Solução Tamponada de Fosfato (PBS), onde se seguiu o seguinte protocolo: foi adicionado 1000µL de PBS em cada tubo contendo o carrapato e em seguida os tubos foram centrifugados a 16000 x g por dez minutos. Este processo foi repetido mais duas vezes.

Visando diminuir custos e gasto de tempo optou-se por realizar a técnica de Hidróxido de Sódio Quente e Tris-HCl (HotSHOT) (TRUETT et al., 2000; SANTOLIN, 2014) que sofreu pequenas modificações para possível otimização da técnica. O procedimento consiste em adicionar 50µL de uma solução alcalina de lise contendo 25mM de NaOH e 0,2mM de EDTA em pH 12.0 e homogeneizar, em seguida as amostras são colocadas em ThermoMixer® ou em estufa em uma temperatura de 95°C para incubar durante 30 minutos. Depois de retiradas do ThermoMixer® as amostras são colocadas em gelo (aproximadamente 4 °C) durante 5 minutos. As amostras são então centrifugadas brevemente após serem retiradas do gelo. Em seguida, adiciona-se 50µL de solução neutralizante, composta de 20 mM de Tris-HCl (pH 8.1) e 0.1 mM de EDTA e homogeneiza-se levemente. O material extraído é retirado do microtubo e colocado em outro microtubo com tampa de rosca de 1,5mL, ficando em um tubo somente o carrapato e no outro somente a parte líquida da amostra extraída, isto é feito para diminuir a ação de possíveis inibidores da PCR.

Primeiramente, foram selecionadas 35 amostras para teste do método de “HotSHOT” que fora comparado com o método de extração por Fenol-Clorofórmio (SANTOLIN, 2014) para testar sua eficiência. As amostras teste foram separadas em quatro lotes diferentes, sendo três lotes para Fenol-Clorofórmio, o primeiro com 9 amostras utilizando Bullet Blender®, o segundo com 9 amostras utilizando Mini Bead Beater® e o quarto com 8 amostras utilizando “Pestle” para maceração dos carrapatos. No terceiro lote foi realizado o método de “HotSHOT” com 9 amostras. Todos os carrapatos selecionados para o teste eram adultos. Após os testes nestas 35 amostras, todos os carrapatos foram submetidos à extração por HotSHOT. Foi feita extração de DNA (TRUETT et al., 2000) de todos os adultos e ninfas

coletados, e para a progênie de cada teleógina, foram selecionadas em média 10 larvas para extração individual de cada uma. No total, foram extraídas 467 amostras.

3.6 Controles Positivos

Amostras de sangue de animais sintomáticos e positivos em lâminas de esfregaço sanguíneo foram utilizados como controle positivo de *E. canis* e *B. vogeli*. As amostras foram extraídas com utilização do kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA controle de *B. vogeli* foi quantificado através do equipamento fluorimétrico Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os controles foram preparados em diluições seriadas em AE. Foram utilizadas as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 para as reações de detecção.

3.7 Reação de PCR para Amplificação de DNA de Carrapatos

Para avaliar a eficiência da extração pelo método de “HotSHOT” e também para comparar a técnica com o método de Fenol-Clorofórmio, todas as amostras de DNA extraídas dos carrapatos foram submetidas à PCR convencional para detecção de um fragmento do gene *Cox*, subunidade I da *citocromo c oxidase*, gene do DNA mitocondrial de carrapatos (HEBERT et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2013). A reação foi realizada em 12µL de volume final contendo: Tampão PCR 1x, 2,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTP, 7,5pmol de cada primer, 1U Taq Platinum DNA polimerase®. Os “primers” utilizados foram LEPF1 (5'-AATCAACCAATCATAAAGATATTGG-3') e LEPR1 (5'-TTAACTTCTGGATGTC CAAAAATCA-3'), gerando um produto de aproximadamente 709 pares de bases. A PCR foi realizada nas seguintes condições de termociclagem: ativação da DNA polimerase a 95°C por 5 minutos seguido de 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 45°C por 40 segundos e extensão 72°C por 1 minuto, e em seguida: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 51°C por 40 segundos e extensão 72°C por 1 minuto. E finalmente, extensão final a 72°C por 5 minutos seguida de pausa a 22°C. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% de concentração e visualizados em iluminação ultravioleta em um fotodocumentador L-PIX sti (Loccus biotecnologia).

3.8 Avaliação da presença de inibidores da PCR

Além da PCR com alvo no gene *Cox* para testar eficiência de extração foram feitos também alguns testes para determinar se as amostras continham inibidores. Foram selecionadas aleatoriamente, 5 amostras de cada grupo dentro das 35 amostras iniciais pra a realização do teste. As 5 amostras foram comparadas com outras 15 amostras extraídas por fenol-clorofórmio, como um parâmetro de comparação. Foram utilizados dois controles positivos, um de *E. canis* e um outro de *B. vogeli*, diluídos na proporção de 1:10, ou seja, 1 parte de DNA controle para 10 partes de tampão AE. As reações de PCR foram realizadas na presença do extrato de DNA do carrapato e do DNA do controle positivo de *E. canis* e *B. vogeli*. Os controles de comparação de eficiência foram feitos adicionando-se metade da quantidade de DNA da amostra padrão e metade de água, para que o volume final ficasse igual em todos os tubos e para que a concentração de controle positivo fosse igual em todas as reações. As amostras então foram submetidas à PCR para amplificação de fragmento do gene

dsb de *Ehrlichia sp* (AGUIAR et al., 2007a) e para amplificação de fragmento do gene *18S rDNA* de piroplasmas (Piro A, Piro B) (PELEG et al., 2010).

3.9.1 Reação de PCR para Detecção de Piroplasmida

A reação para detecção de *B. vogeli* foi executada utilizando-se duas reações, a primeira para triagem e a segunda para diagnóstico. A reação de triagem utilizada foi uma reação de detecção de piroplasmas (OLMEDA et al., 1997; CARRET et al., 1999; PELEG et al., 2010) onde foram utilizados 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, Tampão 1x, 0,25µM de cada “primer”, 0,5U de Platinum® Taq DNA Polymerase e 2,5µL da amostra de DNA. Os “primers” utilizados foram PiroA (5'-AATACCAATCCTGACACAGGGG-3') e PiroB (5'-TTAAATACGAATGCCCAAC-3') que amplificam um fragmento de um gene codificador da unidade *18S* do RNA ribossomal e gera um produto com 407 pares de bases. As reações desta PCR convencional foram padronizadas com um volume final de 12,5µL.

3.9.2 Reação de PCR para Detecção de *Babesia vogeli*

A reação para detecção de *B. vogeli* foi utilizada para a amplificação de um fragmento de 523pb do gene *hsp70* (dados ainda não publicados). Sendo utilizados o “primer forward”: 5'GGACGTTGCTCCCCTCTCA-3' e o “primer reverse”: 5'GCTGACCTCAGAAGCGTCAA-3'. As reações foram feitas utilizando um volume final de 25µL contendo: 0,5 U de Taq DNA polimerase; 1x Tampão; 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (cada); 0,2 µM de cada oligonucleotídeo. As condições de termociclagem foram padronizadas em 94°C por 3min seguido de 35 ciclos a 94°C por 30seg, 60°C por 30seg e 72°C por 40seg e uma extensão final de 72°C por 5min. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado em brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta no aparelho E-Gel Imager (Life Technologies).

3.10 Reação de PCR para Detecção de *Ehrlichia sp.*

Para detecção molecular de *Ehrlichia spp.* foi realizada uma reação de PCR descrita por Aguiar et al. (2007a) onde se utiliza 0,4µM de cada “primer”, 1,25U de Platinum® Taq DNA Polymerase, Tampão 1x, 3mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP e 2,5µL da amostra de DNA. Os primers utilizados foram o *dsb-330* (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') e *dsb-728* (5'CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3') que amplifica um fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia spp.*, resultando num produto de 409 pb. As reações desta PCR convencional foram padronizadas com um volume final de 12,5µL. As condições de termociclagem da PCR foram inicialmente 95°C por 2 minutos seguidos por 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72° por 30 segundos, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% corados em brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta no aparelho E-Gel Imager (Life Technologies).

3.11 Purificação de Produtos e Sequenciamento

Foram selecionadas três produtos da PCR com alvo no gene *dsb* na tentativa de sequenciar os mesmos. Utilizou-se a técnica de purificação com o reagente CleanSweep™

PCR Purification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram enviadas para o sequenciamento no Centro de Estudo do Genoma Humano na Universidade de São Paulo. Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores utilizados na PCR com alvo no gene *dsb* de *Ehrlichia* sp. Todo o sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador automático de DNA (modelo 3500 Applied Biosystems).

3.12 Análise de Identidade

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W no software Mega 7.0 (TAMURA et al. 2013). A identidade das amostras sequenciadas foi determinada a partir da comparação com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank através do algoritmo “Blast n” disponível no endereço eletrônico: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.13 Análise Estatística

Os dados obtidos no estudo foram processados e analisados através do “software” BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2003). Foram utilizados testes que comparam duas variáveis independentes, sendo o Qui-quadrado o teste utilizado para se obter relações entre as variáveis epidemiológicas e a positividade dos carrapatos. Foi tomado um nível de significância de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de Amostras Submetidas à Extração por HotSHOT

Todas as amostras obtiveram resultados similares, mostrando que as amostras extraídas por HotSHOT possuíam DNA passível de amplificação, se equiparando às amostras extraídas pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) que sofreram lise mecânica. A utilização do método de HotSHOT em conjunto com lise mecânica também se mostrou eficiente na obtenção de extratos de DNA de larvas de carrapatos da espécie *Amblyomma parvum*, preservados em RNA later, e submetidos à PCR do mesmo gene alvo do presente estudo (VARELA, 2016). Em seu estudo, Santolin (2014) demonstrou que a amplificação de DNA de *16S rDNA* de procariota em *Rhipicephalus microplus* mostrou-se presente, porém a amplificação só foi observada nas amostras sem diluição e nas amostras diluídas até dez vezes. Segundo Truett et al. (2000), a concentração do DNA obtido através deste método de extração é baixa, o que pode justificar a ausência de amplificação em amostras muito diluídas. Apesar disso, Montero-Pau et al. (2008), utilizando a técnica em ovos diapáusicos de zooplâncton, afirmou que a extração por HotSHOT é adequada para métodos como genotipagem de microsátélites, polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP), análise de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) e sequenciamento. A extração de DNA total a partir de amostras de carrapatos se mostrou funcional frente a métodos comerciais e método de fenol-clorofórmio, porém com menos eficiência que os mesmos segundo Santolin (2014) e Varela (2016).

No teste de inibição para *Ehrlichia canis* no PCR para o gene *dsb*, as amostras extraídas por “HotSHOT” também obtiveram resultados positivos assim como as amostras extraídas por fenol-clorofórmio, com pequenas diferenças na intensidade da banda de produto formada (Figura 10). O teste de inibição para *Babesia vogeli* também resultou em boa eficiência, sendo observados resultados positivos tanto nas amostras extraídas pelo método de lise alcalina quanto nas amostras de fenol-clorofórmio.

De acordo com os resultados alcançados optou-se por realizar a extração de DNA dos carrapatos deste estudo pelo do método de HotSHOT. A PCR com alvo no fragmento do gene *Cox* de espécies de carrapatos (HEBERT et al., 2004) foi realizada em 467 amostras de carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l. Das amostras testadas, 369 obtiveram êxito na amplificação. Das 98 amostras negativas, 43 foram oriundas de carrapatos adultos, 26 de ninfas e 29 de larvas. Foi realizada análise bivariada entre as amostras negativas para verificar se o estágio de vida do carrapato poderia influenciar negativamente na amplificação. Não houve diferença estatística entre as amostras que se apresentaram negativas. Este resultado pode ser justificado devido à ausência da etapa de purificação que é uma característica da extração por lise alcalina, podendo haver ocorrência de amostras mais sensíveis a inibidores (TRUETT et al., 2000; MONTERO-PAU et al., 2008). Para o melhor aproveitamento deste método, recomenda-se a utilização imediata do material (material recém-extraído), pois foi para este objetivo que o mesmo foi criado (TRUETT et al., 2000). Em função dessa característica, é necessário que a manipulação do material seja cuidadosa, para evitar ao máximo sua degradação. Este estudo também procurou demonstrar que a extração de DNA de carrapatos pode ser realizada sem o rompimento do exoesqueleto, isso é muito útil para

espécimes desconhecidos ou com taxonomia duvidosa, pois permite a análise molecular do ixodídeo sem destruir sua morfologia, permitindo a realização de análises morfológicas mesmo após a extração do DNA. As figuras 8 e 9 comprovam essa afirmação, pois são imagens de *R. sanguineus* s.l. após a extração pelo método de HotSHOT.

Para a realização das PCRs visando detectar DNA dos hemoparasitos *E. canis* e *B. vogeli*, foram utilizadas apenas as amostras que resultaram positivas na PCR para o gene *Cox*, totalizando uma quantidade de 369 amostras, sendo 83 larvas, 92 ninfas e 194 adultos (115 fêmeas e 79 machos).

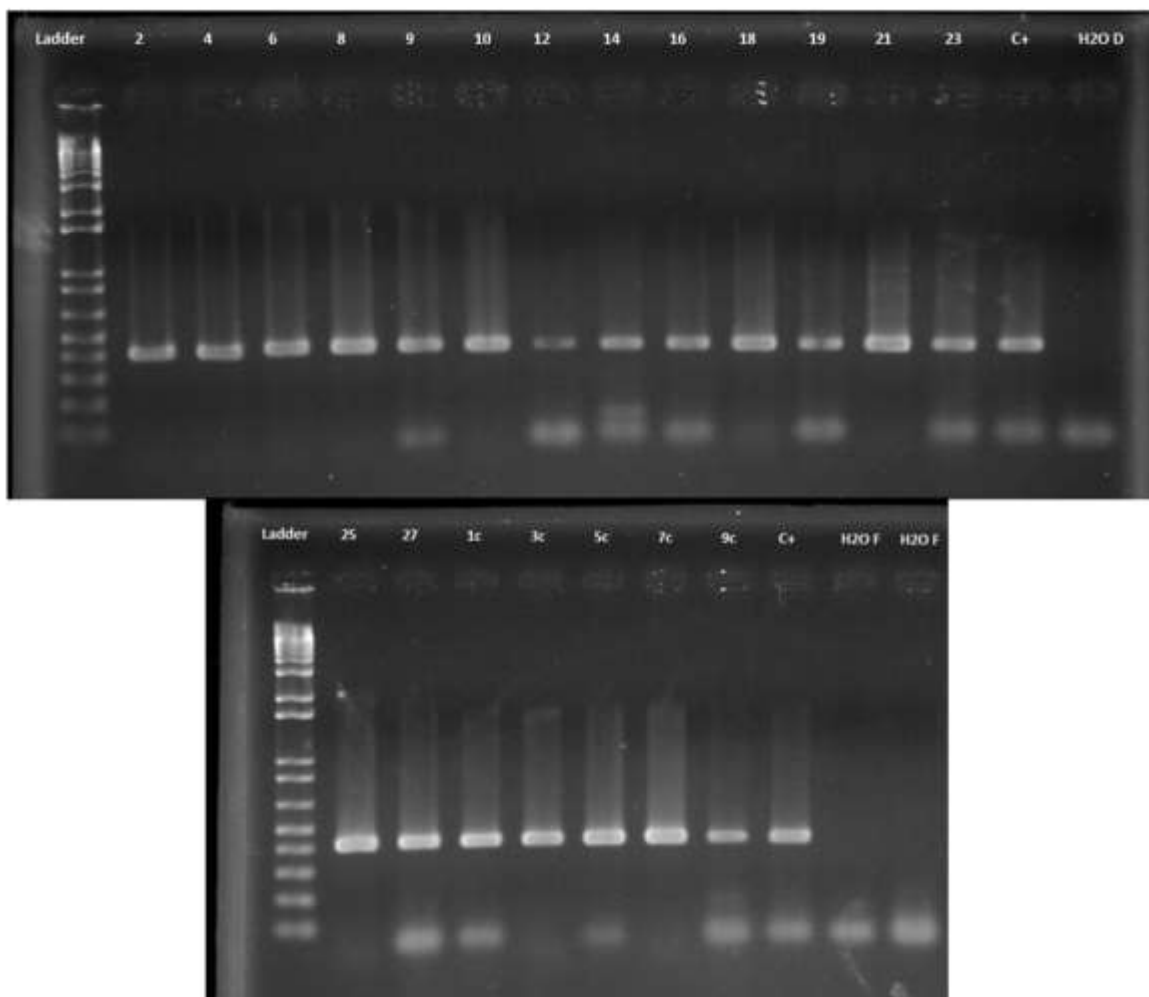


Figura 10 - Géis de eletroforese de reação de inibição de *Ehrlichia* sp. Amostras 2, 4, 6, 8, 9: Bullet Blender® + fenol-clorofórmio; 10, 12, 14, 16, 18: Mini Bead Beater® + FC; 19, 21, 23, 25, 27: Pestle + FC; 1c, 3c, 5c, 7c, 9c: Amostras de HotSHOT sem lise mecânica; C+: controle positivo, *E. canis*; H2OF, H2OD: controles negativos.

4.2 Detecção de *Babesia vogeli*: Aspectos Epidemiológicos

Na PCR para amplificar um fragmento do gene *18S rDNA* de piroplasmas (PiroA/PiroB) foram encontradas 20,05% de amostras positivas (n = 74/369), estas amostras foram selecionadas para realização da PCR com alvo no fragmento do gene *hsp70* específico

de *B. vogeli* e foi observado um total de 6,5% (n = 24/369) amostras positivas para o agente. Dos positivos entre as duas localidades foram obtidos 5,8% (n = 13/224) de carrapatos positivos em Seropédica e 7,58% (n = 11/145) positivos no município de Itaguaí. A frequência de *B. vogeli* em amostras de carrapatos se mostrou uniforme nos dois municípios estudados, não havendo diferença estatística significativa (p=0,6). A frequência de *B. vogeli* mostrou-se concordante com frequências encontradas em outros estudos como o de (HARRUS et al., 2010) onde os mesmos utilizaram pools de carrapatos *R. sanguineus* e *R. turanicus* para detecção de hemoparasitos encontrando uma frequência de *B. vogeli* de 4,2%. Entre as amostras positivas de acordo com o estágio de desenvolvimento do carrapato foram observados 9,63% (8/83) de larvas, 7,6% (7/92) de ninfas e 4,63% (9/194) de adultos positivos para o gene alvo. Não houve diferença significativa (p=0,2) na frequência de amostras de larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* positivas na PCR com alvo no gene *hsp70* para *B. vogeli*. A frequência de *B. vogeli* em carrapatos machos e fêmeas de *R. sanguineus* foi de 2,53% (n = 2/79) e 6,08% (n = 7/115), respectivamente (p=0,3), não havendo diferença significativa. Em condições naturais a proporção total de machos e fêmeas pode variar dependendo da região estudada. No presente estudo, foram obtidos mais fêmeas que machos, sendo 115 contra 79 indivíduos no total geral (p=0,0001). Um estudo de dinâmica populacional realizado no estado de MG mostrou uma quantidade de machos maior que a quantidade de fêmeas, sendo estaticamente significativa (SILVEIRA et al., 2009). Estudos realizados com o objetivo de avaliar a movimentação de carrapatos adultos de *R. sanguineus* mostraram que ambos os carrapatos, machos e fêmeas realizam a movimentação entre diferentes cães (LITTLE et al., 2007). Outro estudo mostra que machos de *R. sanguineus* realizam movimentação entre hospedeiros e são capazes de adquirir e transmitir a infecção de forma transtestadial e intraestadial, independente da presença da fêmea (BREMER et al., 2005). Estes dados mostram que os adultos são muito importantes na dinâmica de transmissão de *E. canis*. No presente estudo, a proporção total entre adultos e ninfas obteve significância, mostrando uma proporção de 2 adultos para 1 ninfa (p=0,01 no teste de aderência de proporções iguais). Um estudo realizado por Silveira et al., (2009) no estado de Minas Gerais, mostrou também uma diferença significativa entre adultos e estágios imaturos coletados, reforçando a importância dos carrapatos adultos em estudos epidemiológicos. A proporção de larvas não foi comparada à proporção de ninfas e adultos devido à forma de obtenção das mesmas. Ninfas e adultos foram coletados da mesma forma enquanto as larvas foram obtidas somente em laboratório através de fêmeas ingurgitadas.

As variáveis ambientais foram associadas com os resultados positivos para *Babesia vogeli*. Entre os carrapatos positivos oriundos da zona rural verificou-se uma frequência de 10,31% (n = 23/223) contra 0,68% (n = 1/146) na zona urbana (p=0,0006). Um estudo de detecção molecular de *Babesia* spp. em sangue de cães provenientes de áreas rurais do estado de São Paulo mostram uma frequência de 8% do agente (O'DWYER et al., 2009), sendo uma frequência próxima ao presente estudo, porém utilizando o hospedeiro vertebrado (cão) como fonte da pesquisa. Um estudo realizado em Pernambuco, utilizando detecção molecular de *Babesia* spp. em carrapatos individuais, encontrou uma frequência de 6% de amostras positivas provenientes da zona rural contra 0% em carrapatos da zona urbana, porém em outro ensaio utilizando pools de carrapatos, Araujo et al., (2015) encontraram maior frequência de positivos em amostras da zona urbana.

Através destes dados, percebe-se que a frequência de *Babesia* spp. pode variar de acordo com o local, tipo de material e a forma como o material é utilizado para a pesquisa do protozoário. Em relação a frequência de carrapatos positivos e a presença/ausência de

abrigos, foi observada uma frequência de 8,83% ($n = 19/215$) nos locais de coleta em que os cães possuíam abrigo e uma frequência de 3,24% ($n = 5/154$) de carrapatos positivos nos locais de coleta em que os cães não possuíam abrigo ($p=0,05$). Esta diferença pode ser explicada devido à biologia de *R. sanguineus* e seu comportamento nidícola, o que faz com que eles necessitem de um ambiente seguro para realizarem as ecdises e fazer postura (DANTAS-TORRES, 2010; MONTEIRO, 2011), essa característica do ciclo biológico de *R. sanguineus* favorece a maior frequência de proximidade com o hospedeiro e consequentemente a infecção do carrapato por *B. vogeli*.

O fato de *B. vogeli* causar doença branda e crônica também pode ser um fator influenciador para a manutenção do agente, pois assim os carrapatos tendem a realizar a manutenção de infecção por *Babesia vogeli* ao se alimentar de cães infectados. Dentro do ciclo do hemoparasito, a transmissão transovariana é um fator que ajuda na manutenção do agente em um mesmo local, ainda mais quando existe um ponto fixo em que se mantém o hospedeiro definitivo (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; IRWIN, 2010; MONTEIRO, 2011). Neste estudo, foram encontrados carrapatos e também ovos dentro de abrigo dos cães, sendo estes de alvenaria ou cimento, o que prova que o ambiente tem condições ótimas para seu desenvolvimento. Na análise bivariada do ambiente predominante encontrado nos locais de coleta, foi observado 8,01% (23/287) das amostras positivas no ambiente predominante de terra e/ou mato, enquanto foi observado 1,21% (1/82) em ambiente predominante de cimento e/ou piso frio ($p=0,02$). O ambiente predominante possui relação estreita com a zona de coleta (rural/urbana). Na zona rural, são observadas mais áreas contendo mato e/ou terra. Observou-se que das 223 amostras contidas na variável “zona rural”, 200 são oriundas de ambiente predominante de terra e/ou mato. Outro argumento que pode justificar a maior positividade de carrapatos nesse tipo de ambiente é devido à dificuldade de controle dos carrapatos nestes locais, mas sabe-se através de conhecimento empírico que realizar controle de carrapatos em ambientes de cimento e/ou piso é mais fácil. O fato de ambientes de terra serem altamente absorventes dificulta o controle de carrapatos através de pulverização. Quanto ao número de cães no local, foram encontrados locais com 1, 2, 3, 4, 6, 14 e 17 cães. Essa variável foi separada em dois grupos sendo o primeiro: 1 a 2 cães (222 amostras) e 3 ou mais cães (147 amostras). A análise bivariada mostrou positivos em 9,0% (20/222) em locais com 1 a 2 cães, enquanto foi observado 2,72% (4/147) de positivos em locais com 3 ou mais cães ($p=0,02$). Esse dado mostra que o fato de o proprietário ter mais cães não é um fator que aumente a probabilidade da presença de *Ehrlichia* sp. no local, podendo este dado depender de características em relação ao manejo realizado pelo proprietário e também de características ambientais como foi mostrado através das variáveis “ambiente predominante” e “zona rural x urbana”. As demais variáveis ambientais como presença/ausência de outras espécies domésticas, se os proprietários dos cães realizam ou não controle de carrapatos, se utilizam métodos físicos de controle e a presença/ausência de gatos no domicílio não foram associadas com a frequência de carrapatos positivos para *B. vogeli* ($p>0,05$) (Tabela 1). Na variável “presença/ausência de animais silvestres”, apesar de não significativo, obteve um p valor interessante ($p=0,07$). A presença de animais silvestres foi analisada em função da frequência de *R. sanguineus* positivos devido ao relato de *B. vogeli* estar presente em felídeos selvagens (ANDRÉ, 2008).

Tabela 1 - Análise descritiva e bivariada das características ambientais em função da frequência de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. positivos através da técnica de PCR com alvo no gene *hsp70* para *Babesia vogeli* em amostras de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro. 2017.

Características do Ambiente	Amostras Positivas		Amostras testadas	Qui-quadrado
	N	%	Total	P valor
Zona				
Rural	23	10,31 ^a	260	0,0006
Urbana	1	0,68 ^b	207	
Outras espécies domésticas?				
Sim	16	5,67 ^a	330	0,3
Não	8	9,19 ^a	137	
Animais Silvestres?				
Sim	20	8,43 ^a	329	0,07
Não	4	3,03 ^a	138	
Controle de Carrapatos?				
Sim	21	6,79 ^a	398	0,7
Não	3	5,0 ^a	69	
Métodos físicos de controle?				
Sim	10	10,1 ^a	113	0,1
Não	14	5,18 ^a	354	
Ambiente Predominante				
Terra/Mato	23	8,01 ^a	372	*0,02
Cimento/Piso Frio	1	1,21 ^b	95	
Presença de Gatos				
Sim	4	3,25 ^a	149	0,11
Não	20	8,13 ^a	318	
Animal Possui Abrigo?				
Sim	19	8,83 ^a	263	0,05
Não	5	3,24 ^a	204	
Quantidade de cães				
1 a 2	20	9,0 ^a	222	0,02
3 ou mais	4	2,72 ^b	147	

*Resultado obtido através do teste Exato de Fisher. aValores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher a 5% de significância (p<0,05).

4.3 Detecção de *Ehrlichia* sp.: Aspectos de Epidemiologia

Após o teste de todas as amostras foram encontradas 41 (11,11%) amostras positivas para *Ehrlichia* sp. A frequência de *E. canis* se mostrou maior que em outros estudos realizados com carrapatos em regiões do Brasil como na cidade de Monte Negro (Rondônia)

sendo 2,3%, Jundiaí e São Paulo (São Paulo) com uma frequência de 6,2% e 3,7% (AGUIAR et al., 2007b). Em um estudo realizado no Pantanal (Mato Grosso), foi observada uma frequência de 0,26% (MELO et al., 2016). O percentual de carrapatos positivos para *Ehrlichia* sp nos municípios de Seropédica e Itaguaí foram de 7,5% (n = 17/224) e 16,55% (n = 24/145), respectivamente (p=0,01). Um estudo epidemiológico realizado por O'Dwyer (2000) entre localidades da mesma região demonstrou uma frequência de 4,8% de *E. canis* através do exame de esfregaços sanguíneos de cães. O estudo comparou estatisticamente a positividade dos cães entre as localidades, porém, não houve significância estatística, com isso, ao que parece não existem outros estudos realizados na região que comparam a frequência de *E. canis* entre os municípios estudados.

Quanto à proporção de carrapatos positivos em função do estágio de desenvolvimento foram observados a presença do DNA de *Ehrlichia* sp em 5,67% (n = 11/194) dos carrapatos adultos, 8,69% (n = 8/92) de ninfas e 26,5% (n = 22/83) das larvas analisadas. Não houve diferença significativa (p>0,05) entre as proporções de larvas e ninfas positivas para *Ehrlichia* sp. No entanto, pode-se verificar uma diferença significativa (p<0,01) na frequência de *Ehrlichia* sp entre larvas e adultos, bem como na frequência de ninfas e adultos (Tabela 2).

Tabela 2 - Percentual de larvas, ninfas e adultos de carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l. positivas para *Ehrlichia* sp através da PCR com alvo no gene *dsb* em amostras de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro. 2017.

Estágio	%	N	Total Geral
Larva	26,5 ^a	22	83
Ninfa	8,69 ^a	8	92
Adulto	5,67 ^a	11	194
Total geral	11,11	41	369

P geral=0,0035; aValores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher a 5% de significância (p<0,05).

Quanto à diferença estatística entre as proporções de carrapatos positivos em cada estágio, pode ser levada em consideração a forma de seleção dos carrapatos para o estudo. Em cada local eram coletados as ninfas e os adultos que eram encontrados na inspeção visual do mesmo. Quanto às larvas, tomava-se uma quantidade média de dez larvas por teleógina coletada, pois a quantidade de larvas de uma postura é muito extensa. Com isso a desproporção da quantidade de cada estágio pode ter influenciado no resultado. Numa progênie positiva, não se tem informação na literatura da proporção de larvas que são infectadas. No presente estudo, as 22 larvas positivas pertenciam a seis teleóginas diferentes, sendo 66,66% das teleóginas coletadas no estudo (6/9). As proporções de larvas positivas e negativas foram variadas. As larvas positivas para *Ehrlichia* sp foram os dados mais interessantes neste estudo, uma vez que não há descrição na literatura de transmissão transovariana em carrapato por *E. canis*, havendo apenas a comprovação por diversos autores da transmissão transestadial (GROVEZ et al., 1975; JOHNSON et al., 1998; LONG et al., 2003; FOURIE et al., 2013). Neste estudo é possível afirmar que nenhuma larva se alimentou, pois todas eclodiram em câmara climatizada do tipo B.O.D., sendo assim, descartou-se a

possibilidade dos resultados PCR-positivos serem advindos da ingestão de sangue de cão infectado (Figura 11).

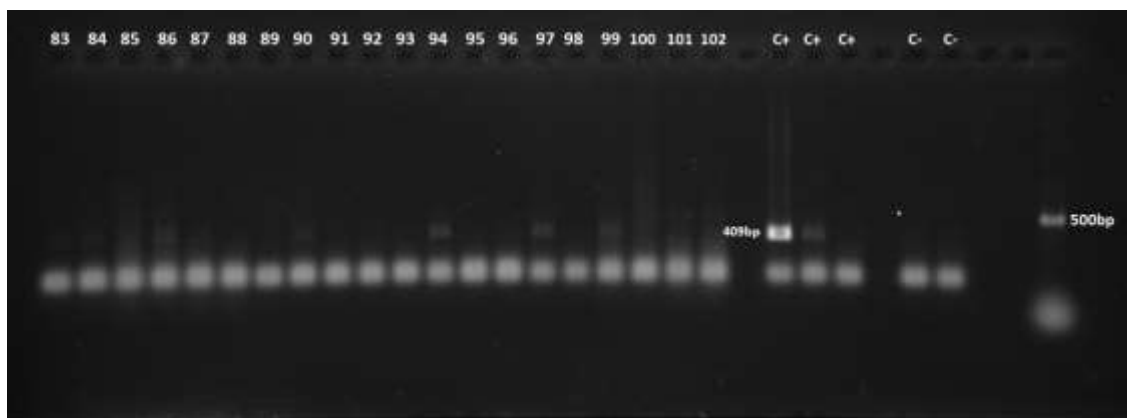


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos de PCR do fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia* sp. Amostras 94 e 97: larvas positivas; C+: Controles positivos em diluição 1:10, 1:100 e 1:500, nesta mesma ordem no gel; C-: controles negativos. O peso molecular utilizado é o último poço com tamanho total de 500bp.

A presença de *E. canis* nestas larvas de *R. sanguineus* desta região pode ser justificada devido à possibilidade de diferenças biológicas entre os grupos de *R. sanguineus* sensu lato presentes no Brasil. Moraes-Filho et al., (2015) avaliaram a capacidade vetorial de *E. canis* em quatro diferentes grupos de *R. sanguineus*, sendo um grupo do estado de São Paulo, estado do Rio Grande do Sul e de dois países vizinhos, Argentina e Uruguay. Os autores concluíram que existem diferenças na capacidade vetorial entre os diferentes grupos, mostrando que somente o grupo de carrapatos do estado de São Paulo possui competência vetorial. Com isso pode-se levantar a hipótese de que, no presente estudo carrapatos na região estudada podem possuir diferenças em sua capacidade de albergar e transmitir *E. canis*. Moraes-Filho et al., (2015) também demonstraram que carrapatos 7 dias após a ecdise apresentaram uma maior taxa de infecção por *E. canis* do que em carrapatos testados 30 dias após ecdise. Com isso, eles levantaram a hipótese de que poderia haver uma quantidade residual do agente no corpo destes carrapatos e por isso a queda na taxa de infecção de acordo com a idade do carrapato. No presente estudo este argumento também pode ser levado em consideração, apesar de se tratar de diferentes estágios de desenvolvimento, pode-se levantar a hipótese de que larvas de *R. sanguineus* ao nascer podem conter certa quantidade de *E. canis* em seus corpos, porém, insuficiente para serem transmitidas. Outra hipótese a ser levantada também é que as larvas podem oferecer condições adversas para a sobrevivência da bactéria e esta pode vir a desaparecer conforme as mesmas se desenvolvem. Em outro estudo, avaliando o crescimento de *E. canis* em cultivo celular de células oriundas de diversas espécies de carrapatos, Ferrolho et al. (2016) também levantaram a hipótese de alguns grupos de *R. sanguineus* s.l. serem refratários ao crescimento de *E. canis* em seu interior. Isto reforça ainda mais a possibilidade de haverem subgrupos de *R. sanguineus* s.l. com características biológicas mais favoráveis para o desenvolvimento de *E. canis* do que outros, contudo, para a obtenção de maior embasamento, são necessários mais estudos de cunho experimental utilizando carrapatos da microrregião de Itaguaí para assim justificar melhor os resultados obtidos neste estudo. Não

foram observados outros estudos que mostram larvas de *R. sanguineus* positivas para *E. canis*, o que dificulta a melhor argumentação destes dados.

Nos resultados positivos entre os adultos observou-se uma frequência de 5,06% (n = 4/79) de carrapatos machos positivos contra 6,08% (n = 7/115) de fêmeas positivas na PCR com alvo no gene *dsb* de *Ehrlichia* sp, não havendo diferença significativa entre eles (p=0,5).

Sobre as análises das variáveis ambientais (extrínsecas) relacionadas com os carrapatos positivos para *E. canis*, foi observado que na variável “métodos físicos de controle” houve 17,17% (17/99) de positivos onde havia utilização desses métodos enquanto em locais onde o mesmo não era utilizado obteve-se 8,88% (24/270) de positivos (p=0,03). Estes dados podem levar a crer que os métodos físicos de controle, como a vassoura de fogo sejam inúteis para o controle de carrapato e conseqüentemente de *E. canis* nos mesmos, entretanto, analisando estes locais onde se faz controle físico também se observa que dos sete pontos de coleta onde o método é realizado, em seis deles também se utiliza métodos químicos de controle de carrapatos. Com isso pode se considerar que talvez, o uso de métodos de controle independente de sua natureza não sejam fatores influenciadores para a presença de *E. canis* no local. Isto pode ser devido à resistência dos carrapatos aos métodos, ao uso errático dos métodos pelos proprietários, entre outros. Dentre as outras variáveis ambientais (extrínsecas) analisadas em relação aos carrapatos positivos para *E. canis*, não foram observadas mais características com associação significativa na análise bivariada (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise descritiva e bivariada das características ambientais em função da frequência de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. positivos através da técnica de PCR com alvo no gene *dsb* para *Ehrlichia* sp em amostras de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro. 2017.

Características do Ambiente	Amostras Testadas			Valor de p (Qui- quadrado)
	N	%	Total Geral	p-valor
Zona				
Rural	28	12,55 ^a	223	0,3
Urbana	13	8,9 ^a	146	
Outras espécies domésticas?				
Sim	27	9,57 ^a	282	0,13
Não	14	16,09 ^a	87	
Animais Silvestres?				
Sim	31	13,08 ^a	237	0,14
Não	10	7,57 ^a	132	
Controle de Carrapatos?				
Sim	37	11,97 ^a	309	0,3
Não	4	6,66 ^a	60	
Métodos físicos de controle?				
Sim	17	17,17 ^a	99	0,03
Não	24	8,88 ^b	270	
Ambiente Predominante				
Terra/Mato	33	11,49 ^a	287	0,8
Cimento/Piso Frio	8	9,75 ^a	82	
Presença de Gatos				
Sim	14	11,38 ^a	123	0,9
Não	27	10,97 ^a	246	
Animal Possui Abrigo?				
Sim	24	11,16 ^a	215	0,8
Não	17	11,03 ^a	154	
Número de cães				
1 a 2	27	12,16 ^a	222	0,5
3 ou mais	14	9,52 ^a	147	

aValores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher a 5% de significância (p<0,05).

4.4 Análise de Identidade

Os “primers” utilizados na reação são somente gênero específico, com isso, a confirmação da espécie de *Ehrlichia* envolvida foi realizada através do sequenciamento. Duas amostras positivas oriundas de larvas e uma de adulto foram sequenciadas e o resultado mostrou que as mesmas apresentaram identidade de 99% com *E. canis*, inclusive com identidade para amostras nacionais (GU586135.1). Dessa forma, pode-se suspeitar que a espécie de *Ehrlichia* detectada nas demais amostras trata-se da espécie *E. canis*.

5 CONCLUSÕES

O método de HotSHOT sem lise mecânica se mostra um método alternativo quando se busca um método de extração de DNA de carrapatos de baixo custo e rápido, porém, são necessários mais estudos para padronização das PCRs que utilizam o DNA extraído a partir desta técnica.

Na região estudada a prevalência de *Babesia vogeli* é maior em áreas rurais quando comparados com áreas urbanas.

A presença de abrigo é um fator influenciador na presença de *Babesia canis* em carrapatos nos municípios estudados.

Pode-se afirmar a presença do DNA de *Ehrlichia* sp em larvas de *R. sanguineus* s.l. não alimentadas, o que sugere a ocorrência de transmissão transovariana desse microrganismo no carrapato. Porém, são necessários mais estudos experimentais para comprovar este dado encontrado no presente estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, K.; TATEISHI, M.; HORII, Y.; NAGATOMO, H.; SHIMIZU, T.; MAKIMURA, S. Immunologic characteristics of anti-erythrocyte membrane antibody produced in dogs during *Babesia gibsoni* infection. **Journal of Veterinary Med Sci**, v. 57, n. 1, p. 121–123, 1995.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126–132, 2007.
- ALASAAD, S.; ROSSI, L.; MAIONE, S.; SARTORE, S.; SORIGUER, R. C.; PÉREZ, J. M.; RASERO, R.; ZHU, X. Q.; SOGLIA, D. HotSHOT Plus ThermalSHOCK , a new and efficient technique for preparation of PCR-quality mite genomic DNA. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1455–1457, 2008.
- ALCAIDE, M.; RICO, C.; RUIZ, S.; SORIGUER, R.; MUÑOZ, J.; FIGUEROLA, J. Disentangling vector-borne transmission networks : A universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. **PloS one**, v. 4, n. 9, p. 1–6, 2009.
- ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação Parasitológica, Hematológica e Bioquímica Sérica da Fase Aguda de Cães e Gatos Experimentalmente Infectados. 1998. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- AMMAZZALORSO, A. D.; ZOLNIK, C. P.; DANIELS, T. J.; KOLOKOTRONIS, S.-O. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). **PeerJ**, p. 1–14, 2015.
- ANDRÉ, M. R. **Detecção molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro**. 2008. Universidade Estadual Paulista, 2008.
- ARAUJO, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; AZEVEDO, S. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; RIBEIRO, M. F. B.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 456–461, 2015.
- ARMAS, Y. de; RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J. A. Modification of a method to extract genomic DNA from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana**, v. 31, p. 203–206, 2005.
- AYOOB, A. L.; HACKNER, S. G.; PRITTIE, J. Clinical management of canine babesiosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 77–89, 2010.
- BANETH, G. Tick-borne infections of animals and humans : A common ground. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 9, p. 591–596, 2015.

BARKER, E. N.; LANGTON, D. A.; HELPS, C. R.; BROWN, G.; MALIK, R.; SHAW, S. E.; TASKER, S. Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote Aboriginal communities in Australia. **Veterinary Research**, v. 55, n. 8, p. 1–7, 2012.

BARREIRA, J. D. Efeitos da infecção de *Babesia bigemina* (smith & kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 2001. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001.

BARROS-BATTESTI, D. M. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: ICTTD, 2006.

BICALHO, K. A.; RIBEIRO, M. F. B.; MARTINS-FILHO, O. A. Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotozoan *Babesia canis* infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 221–235, 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, n. 1–2, p. 18–29, 2006.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885–904, jul. 2003.

BOTELHO, M. de C.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T. de; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 73–86, 2004.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J. J.; WAGNER, E. R.; 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.

CACCIÒ, S.; CAMMÀ, C.; ONUMA, M.; SEVERINI, C. The *B-tubulin* gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 0–4, 2000.

CARCY, B.; RANDAZZO, S.; DEPOIX, D.; ADASZEK, L.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; GORENFLOT, A.; SCHETTERS, T. P. Classification of *Babesia canis* strains in Europe based on polymorphism of the *Bc28 1 -gene* from the *Babesia canis Bc28* multigene family. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3–4, p. 111–123, 2015.

CARDOSO, L.; TUNA, J.; VIEIRA, L.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 2, p. 232–233, 2010.

CARNOHAN, L. P.; KAUFMAN, P. E.; ALLAN, S. A.; GEZAN, S. A.; WEEKS, E. N. I. Evaluation of four bed bug traps for surveillance of the brown dog tick (Acari : Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, p. 1–9, 2015.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, É.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. v. 46, n. 3, p. 298–

303, 1999.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia , Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657–662, 2008.

CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 91–98, 2006.

CORALES, J. M. I.; VILORIA, V. V.; VENTURINA, V. M.; MINGALA, C. N. The prevalence of *Ehrlichia canis* , *Anaplasma platys* and *Babesia* spp . in dogs in Nueva Ecija , Philippines based on multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay. **Annals of Parasitology**, v. 60, n. 4, p. 267–272, 2014.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State , Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, p. 321–326, 2013.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; ZAHLER-RINDER, M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RABELO, E. M. L.; PASSOS, L. M. F. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 160–163, 2012.

COSTA, A. P. da; COSTA, F. B.; LABRUNA, M. B.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; SOARES, J. F.; SPOLIDORIO, M. G.; GUERRA, R. de M. S. N. de C. G. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli* , *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão , northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 28–35, 2015.

CROWDER, C. D.; ROUNDS, M. A.; PHILLIPSON, C. A.; PICURI, J. M.; MATTHEWS, H. E.; HALVERSON, J.; SCHUTZER, S. E.; ECKER, D. J.; ESHOO, M. W.; CROWDER, C. D.; ROUNDS, M. A.; PHILLIPSON, C. A.; PICURI, J. M.; MATTHEWS, H. E.; HALVERSON, J.; SCHUTZER, S. E.; ECKER, D. J. Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 47, n. 1, 2010.

DAGNONE, A. S.; DE 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, n. 4, p. 285–290, 2003.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A. de; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191–201, 2001.

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

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 26, p. 1–11, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; OTRANTO, D. Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 527–536, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & Vectors**, v. 213, 2013.

DHARMARAJAN, G.; RHODES, O. E. Evaluating levels of PCR efficiency and genotyping error in DNA extracted from engorged and non-engorged female *Dermacentor variabilis* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 109–112, 2011.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y.-W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504–510, 2005.

DUARTE, S. C.; LINHARES, G. F. C.; ROMANOWSKY, T. N.; NETO, O. J. da S.; BORGES, L. M. F. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 16–20, 2008.

FERROLHO, J.; SIMPSON, J.; HAWES, P.; ZWEYGARTH, E.; BELL-SAKYI, L. Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 631–637, 2016.

FOURIE, J. J.; STANNECK, D.; LUUS, H. G.; BEUGNET, F.; WIJNVELD, M.; JONGEJAN, F. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 595–603, 2013.

FOURNIER, P.-E.; DURAND, J.-P.; ROLAIN, J.-M.; CAMICAS, J.-L.; TOLOU, H.; RAOULT, D. Detection of Astrakhan fever rickettsia from ticks in Kosovo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 158–61, 2003.

FRYXELL, R. T. T.; STEELMAN, C. D.; SZALANSKI, A. L.; BILLINGSLEY, P. M.; WILLIAMSON, P. C. Molecular detection of *Rickettsia* species within ticks (acari: Ixodidae) collected from Arkansas United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 500–508, 2015.

FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; INOUE, N.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; SUZUKI, H. Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potentiality. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 131, p. 129–136, 2003.

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 33, n. 3, p. 1–10, 2010.

GHAFFAR, M. W.; AMER, S. A. Prevalence and first molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic anaplasmosis, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt. **Journal of Advanced**

Research, v. 3, n. 2, p. 189–194, 2012.

GHIRBI, Y. M.; GHORBEL, A.; AMOURI, M.; NEBAOUI, A.; HADDAD, S.; BOUATTOUR, A. Clinical , serological , and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitology Research**, v. 104, p. 767–774, 2009.

GONÇALVES, L. R.; FILGUEIRA, K. D.; AHID, S. M. M.; PEREIRA, J. S.; DO 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. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 407–412, 2014.

GREENE, C. E. **INFECTIOUS DISEASES OF THE DOG AND CAT**. [s.l.] ELSEVIER, 2012.

GROVEZ, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 937–940, 1975.

GUY, E. C.; STANEK, G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, n. 1, p. 610–611, 1991.

HARRUS, S.; MUMCUOGLU, K. Y.; MORICK, D.; EYAL, O.; BANETH, G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* , *Anaplasma bovis* , *Anaplasma platys* , *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, 2010.

HARRUS, S.; PERLMAN-AVRAHAMI, A.; MUMCUOGLU, K. Y.; MORICK, D.; BANETH, G. Molecular detection of *Rickettsia massiliae* , *Rickettsia sibirica mongolitimonae* and *Rickettsia conorii israelensis* in ticks from Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 2, p. 176–180, 2011.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14812–7, 2004.

HILL, C. A.; GUTIERREZ, J. A. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 224–227, 2003.

HODGKINSON, J. E. Molecular diagnosis and equine parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 109–116, 2006.

HUBBARD, M. J.; CANN, K. J.; WRIGHT, D. J. M. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 19, p. 473–478, 1995.

- INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 343–348, 2003.
- IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. Suppl 1, p. S4, 2009.
- IRWIN, P. J. Canine Babesiosis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1141–1156, 2010.
- JACOBS, D. E.; SCHNIEDER, T. Application of molecular biology to the diagnosis of parasitic disease. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 67–68, 2006.
- JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; CROW, D. W.; KOCAN, K. M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 277–288, 1998.
- KAMANI, J.; BANETH, G.; MUMCUOGLU, K. Y.; WAZIRI, N. E.; EYAL, O. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2013.
- KHASNATINOV, M. A.; LIAPUNOV, A. V.; MANZAROVA, E. L.; KULAKOVA, N. V.; PETROVA, I. V.; DANCHINOVA, G. A. The diversity and prevalence of hard ticks attacking human hosts in Eastern Siberia (Russian Federation) with first description of invasion of non-endemic tick species. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 501–510, 2016.
- KOBAYASHI, A.; IWASAKI, H. Human feet bitten by multiple brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus*. **IDCases**, v. 9, n. April, p. 8, 2017.
- KOCH, H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 75, n. 5, p. 583–586, 1982.
- KOSTRO, K.; STOJECKI, K.; GRZYBEK, M.; TOMCZUK, K. Characteristics, immunological events, and diagnostics of *Babesia* spp. infection, with emphasis on *Babesia canis*. **Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy**, v. 59, p. 495–504, 2015.
- LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, n. 1, p. 17–32, 2005.
- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002.
- LEMONS, T. D. **Frequência e caracterização molecular de *Babesia* spp . em cães naturalmente infectados no município de Teresópolis - RJ**. 2009. Universidade Federal Fluminense.
- LITTLE, S. E.; HOSTETLER, J.; KOCAN, K. M. Movement of *Rhipicephalus sanguineus*

adults between co-housed dogs during active feeding. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1–2, p. 139–145, 2007.

LONG, S. W.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; RUBLE, R. P.; TEEL, P.; YU, X. Evaluation of Transovarial transmission and transmissibility of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 6, 2003.

MAGNARELLI, L. A. Global Importance of Ticks and Associated Infectious Disease Agents. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 5, p. 33–37, 2009.

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas , hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. 2010. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

MATEI, I. A.; D'AMICO, G.; YAO, P. K.; IONICĂ, A. M.; KANYARI, P. W. N.; DASKALAKI, A. A.; DUMITRACHE, M. O.; SÁNDOR, A. D.; GHERMAN, C. M.; QABLAN, M.; MODRÝ, D.; MIHALCA, A. D. Molecular detection of *Anaplasma platys* infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 157, 2016.

MEDEIROS-SILVA, V.; GURGEL-GONÇALVES, R.; NITZ, N.; MORALES, L. E. D. A.; CRUZ, L. M.; SOBRAL, I. G.; BOITÉ, M. C.; FERREIRA, G. E. M.; CUPOLILLO, E.; ROMERO, G. A. S. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 258, 2015.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Adv Parasitology**, v. 23, p. 370–403, 1984.

MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, 2016.

MENTZ, M. B.; TROMBKA, M.; SILVA, G. L. da; SILVA, C. E. *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) biting a human being in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 35, p. 2–4, 2016.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2011.

MONTERO-PAU, J.; GÓMEZ, A.; MUÑOZ, J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 6, p. 218–222, 2008b.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLOS ONE**, p. 1–17, 2015.

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, n. 2–3, p. 197–204, 2003.

NAKAGHI, A. C. H. **Clonagem do gene *p28* e análise da expressão da proteína recombinante a partir da amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* e sua aplicação no diagnóstico da erliquiose canina**. 2008. Universidade Estadual Paulista.

NAZARI, M.; LIM, S. Y.; WATANABE, M.; SHARMA, R. S. K.; CHENG, N. A. B. Y.; WATANABE, M. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Malaysia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; DEMMA, L.; TRAEGER, M.; JOHNSON, B.; DICKSON, J.; MCQUISTON, J.; SWERDLOW, D. Rocky mountain spotted fever in Arizona : Documentation of heavy environmental infestations of *Rhipicephalus sanguineus* at an endemic site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 338–341, 2006.

NÓBREGA, K. Q. **Estudo das principais doenças infecciosas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília entre 2011 e 2014**. 2015. Universidade de Brasília.

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, n. 2, p. 206–210, 2006.

O’DWYER, L. H. **Diagnóstico de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes de áreas rurais em três mesorregiões do estado do Rio de Janeiro , Brasil**. 2000. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

O’DWYER, L. H.; LOPES, V. V. A.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. dos S.; RIBOLLA, P. E. M. *Babesia* spp . infection in dogs from rural areas of São Paulo State , Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 23–26, 2009.

OIE. Quality management in veterinary testing laboratories. In: **OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: Office International des Epizooties (OIE), 2004. p. 1–31.

OLIVEIRA, A. C. de. **Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia molecular, alterações hematológicas e centrifugação por gradiente**. 2015. Universidade Federal de Viçosa.

OLMEDA, A. S.; ARMSTRONG, P. M.; ROSENTHAL, B. M.; VALLADARES, A.; CASTILHO, A. del; ARMAS, F. de; MIGUELEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ, J. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD III, S. R. Short report - A subtropical case of human babesiosis. **Acta Tropica**, v. 67, p. 229–234, 1997.

OSKAM, C. L.; GOFTON, A. W.; GREAY, T. L.; YANG, R.; DOGGETT, S.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. Molecular investigation into the presence of a *Coxiella* sp. in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 141–145, 2017.

OTRANTO, D.; TESTINI, G.; DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; DINIZ, P. P. V. de P.; CAPRARIIS, D. de; LIA, R. P.; MENCKE, N.; STANNECK, D.; CAPELLI, G.; BREITSCHWERDT, E. B. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3316–3324, 2010.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148–155, 2011.

PAT-NAH, H.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; VILLEGAS-PEREZ, S. L. U. Z.; REYES-NOVELO, E. Molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, 2015.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. World map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 259–263, 2006.

PELEG, O.; BANETH, G.; EYAL, O.; INBAR, J.; HARRUS, S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3–4, p. 292–299, 2010.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human Infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 110–117, 2006.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; CANÇADO, P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 11, n. 1, p. 29–36, 2011.

POST, R. J.; FLOOKT, P. K.; MILLEST, A. L. Methods for the preservation of insects for DNA studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 1, p. 85–92, 1993.

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.

RODRÍGUEZ, I.; FRAGA, J.; NODA, A. A.; MAYET, M.; DUARTE, Y.; ECHEVARRIA, E.; FERNÁNDEZ, C. An alternative and rapid method for the extraction of nucleic acids from ixodid ticks by potassium acetate procedure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 542–547, 2014.

ROTONDANO, T. E. de F.; ALMEIDA, H. K.; KRAWCZAK, F. S.; SANTANA, V. L.; VIDAL, I. F.; LABRUNA, M. B.; AZEVEDO, S. S. de; ALMEIDA, A. M. P. de; MELO, M. A. de. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 52–58, 2015.

RUDOLER, N.; BANETH, G.; EYAL, O.; STRATEN, M. Van; HARRUS, S. Evaluation of

an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. **Vaccine**, v. 31, p. 226–233, 2012.

SAINZ, Á.; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 75, n. 8, p. 1–20, 2015.

SALEM, N. Y.; FARAG, H. S. Clinical , Hematologic , and molecular findings in naturally occurring *Babesia canis vogeli* in egyptian dogs. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, p. 16–19, 2014.

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. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd. ed. NY: Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOLIN, Í. D. A. C. **Estudo ecológico de carrapatos associados com aves no entorno do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil; seu papel como bioindicadores e/ou agentes patogênicos de risco para saúde silvestre e coletiva**. 2014. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; 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.

SANTOS, H. A.; THOMÉ, S. M. G.; BALDANI, C. D.; SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; PIRES, M. S.; VITARI, G. L. V.; COSTA, R. L.; SANTOS, T. M.; ANGELO, I. C.; SANTOS, L. A.; FACCINI, J. L. H.; MASSARD, C. L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 555042, p. 348, 2013.

SCHOTTHOEFER, A. M.; MEECE, J. K.; IVACIC, L. C.; BERTZ, P. D.; ZHANG, K.; WEILER, T.; UPHOFF, T. S.; FRITSCH, T. R. Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: Importance of infection time course for optimal test utilization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2147–2153, 2013.

SHORTT, H. E. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 3, 1973.

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

SMITH, F. D.; ELLSE, L.; WALL, R. Prevalence of *Babesia* and *Anaplasma* in ticks

- infesting dogs in Great Britain. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1–2, p. 18–23, 2013.
- SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 48–60, 2011.
- SOLANO-GALLEGU, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M.; ZAMPIERON, C.; RAZIA, L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ALBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 315–319, 2007.
- SOLANO-GALLEGU, L.; TROTTA, M.; RAZIA, L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 515–518, 2006.
- SPARKES, J.; KORTNER, G.; BALLARD, G.; FLEMING, P. J. S.; BROWN, W. Y. Effects of sex and reproductive state on interactions between free-roaming domestic dogs. **PLOS ONE**, p. 1–14, 2014.
- SPOLIDORIO, M. G.; MINERVINO, A. H. H.; VALADAS, S. Y. O. B.; SOARES, H. S.; NEVES, A. L.; LABRUNA, M. B.; RIBEIRO, M. F. B.; GENNARI, S. M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon , Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 214–219, 2013.
- SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. de M.; CAMPOS, W. N. da S.; MELO, A. L. T.; 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, n. 3, p. 253–255, 2011.
- TORINA, A.; BLANDA, V.; ANTOCI, F.; SCIMECA, S.; AGOSTINO, R. D.; SCARIANO, E.; PIAZZA, A.; GALLUZZO, P. A molecular survey of *Anaplasma* spp ., *Rickettsia* spp ., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. v. 60, p. 125–130, 2013.
- TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; AUTRAN, H. S.; MORAIS, D. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 177–180, 2006.
- TRUETT, G. E.; HEEGER, P.; MYNATT, R. L.; TRUETT, A. A.; WALKER, J. A.; WARMAN, M. L. Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). **BioTechniques**, v. 29, n. 1, p. 52–54, 2000.
- UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu , Estado de São Paulo , Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 57–61, 2009.
- VARELA, J. B. **Influência dos métodos de conservação sobre a recuperação e a frequência de amplificação de marcadores mitocondriais e nucleares de carrapatos das espécies *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)**. 2016. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANDRÉ, M. R.; FARIA, J. L. M.; MUNHOZ, T. D.;

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, M.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 254–260, 2012.

VERLENGIA, R.; CURI, R.; BEVILACQUA, E.; NEWSHOLME, P. **Análises de RNA, proteínas e metabólitos: metodologia e procedimentos técnicos**. 1st. ed. São Paulo: Santos, 2013.

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. da C.; NASCIMENTO, D. A. G. do; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. dos S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana state , Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 104–109, 2013.

VILELA, J. A. R.; PIRES, M. S.; SILVA, C. B. da; PEIXOTO, M. P.; FALQUETO, A.; SANTOS, H. A.; SANAVRIA, A.; FACCINI, J. L. H. Clinical-hematological changes due to *Babesia canis vogeli* infection in dogs from Seropédica , Rio de Janeiro , Brazil. **REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA VETERINARIA**, v. 35, n. 1, 2013.

WIELINGA, P. R.; GAASENBEEK, C.; FONVILLE, M.; BOER, A. De; VRIES, A. De; DIMMERS, W.; AKKERHUIS, G.; JAGERS, O.; SCHOULS, L. M.; BORGSTEEDE, F.; GIESSEN, J. W. B. Van Der. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia* , *Anaplasma* , and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in the netherlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7594–7601, 2006.

WINKEL, K. T.; RIBEIRO, P. B.; ANTUNES, L. O.; CÁRCAMO, M. C.; VIANNA, É. E. S. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Ixodidae) in synantropic rodents in Rio Grande do Sul , Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 276–279, 2014.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. dos A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá , Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3811–3822, 2013.

YBAÑEZ, A. P.; PEREZ, Z. O.; GABOTERO, S. R.; YANDUG, R. T.; KOTARO, M.; YBA, A. P.; INOKUMA, H. First molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks from dogs in Cebu , Philippines. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 287–292, 2012.

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.

7 ANEXOS

Anexo I – Questionário epidemiológico semi-estruturado aplicado aos moradores visitados nos municípios de Itaguaí e Seropédica, Rio de Janeiro.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: ____/____/____ Propriedade N° _____ Zona: () Rural () Urbana

Localidade: _____ Coord. Geográf.: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

Pt de referência: _____ Temperatura ambiente: _____

Tel: _____ e-mail: _____

Tipo de residência: () pau a pique () alvenaria () outros:

Tipo de vegetação predominante: _____

Quantos cães em casa: ____

Pratica alguma ação para controle de ectoparasitos?

() sim () não Qual? _____

Leva o cão ao veterinário?

() sim () não Qual a Periodicidade? _____

Presença de outras espécies domésticas:

() gatos () bovinos () equinos () outros: Quais? _____

Presença de animais silvestres:

() capivara () gambá () outros: _____

Proprietário informado sobre doenças transmitidas por carrapatos? Qual? _____

Nunca ouviu falar () Já ouviu falar () Sabe da relação com o cão () Sabe da relação com o carrapato () Conhece algum sintoma ()

Proprietário informado sobre os riscos dos carrapatos? ()

Conhece o nome do vetor () Conhece a forma de transmissão ()

Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? _____

Utiliza prod. inseticidas no ambiente?

() sim () não Quais? _____ Intervalos? _____

Utiliza mét. Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

() sim () não Quais? _____ Intervalos? _____

Outras **observações** **relevantes:**
