

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis* EM  
CÃES DE ÁREA RURAL NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

**Rafaela Souza Abdo Elias**

**2023**



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

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis* EM  
CÃES DE ÁREA RURAL NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

**RAFAELA SOUZA ABDO ELIAS**

*Sob a Orientação do Professor  
Huarrisson Azevedo Santos*

e Co-orientação da  
**Dr<sup>a</sup> Patrícia Gonzaga Paulino**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias no Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2023

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

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

E991a ELIAS, Rafaela Souza Abdo, 1993-  
ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE Babesia vogeli e  
Ehrlichia canis EM CÃES DE ÁREA RURAL NO ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO. / Rafaela Souza Abdo ELIAS. - Rio de  
Janeiro, 2023.  
57 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.  
Coorientador: Patrícia Gonzaga Paulino.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2023.

1. 2023. I. Azevedo Santos, Huarrisson ,  
18/03/1980-, orient. II. Gonzaga Paulino, Patrícia ,  
17/07/1990-, coorient. III Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro. Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 4500/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.068677/2023-72

Seropédica-RJ, 11 de outubro de 2023.

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

RAFAELA SOUZA ABDO ELIAS

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/10/2023

(Assinado digitalmente em 16/10/2023 16:45)  
CLAUDIA BEZERRA DA SILVA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: ###035#8

(Assinado digitalmente em 16/10/2023 14:46)  
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matricula: ###014#2

(Assinado digitalmente em 16/10/2023 08:11)  
ANA PAULA MARTINEZ DE ABREU  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.387-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **4500**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **11/10/2023** e o código de verificação: **7a3e86d79b**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por ter me permitido chegar até aqui. Em seguida agradeço meus pais, Andréa Abdo e Célio Abdo, por todo apoio, força, dedicação e incentivo que sempre me proporcionaram e por nunca terem medido esforços para que eu pudesse seguir com meus sonhos. Também quero agradecer meus avós, Vanilde Benevides e João Roberto, por todo amor, carinho e apoio, vocês são muito especiais e importantes para mim.

Agradeço a Daniele Santos e ao Técnico Josemar por terem me ensinado tanto no campo quanto dentro do laboratório, a caminhada nem sempre foi fácil, mas com o apoio, força, carinho e amizade de vocês a jornada se tornou mais leve e divertida, muito obrigada por sempre terem acreditado na minha capacidade e por estarem sempre ao meu lado, sou extremamente grata por tudo que fizeram por mim, vocês sempre terão um lugar especial dentro do meu coração.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos Vanessa Karoline, Carolina Caccavo, Thaís Oliveira, Wellington de Souza e Thiago Alves por todo apoio, força, compressão e por estarem sempre ao meu lado, a amizade de vocês me fortalece e me inspira a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço também ao meu orientador Professor Dr. Huarrisson Azevedo por ter me dado essa oportunidade e ter contribuído tanto para o meu crescimento profissional, a experiência do mestrado foi transformadora para mim. Assim como, agradeço a minha co-orientadora Dra. Patrícia Paulino por todos os ensinamentos e por me auxiliar mais uma vez na minha trajetória.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

## RESUMO

ELIAS, Rafaela Souza Abdo. **Análise epidemiológica de *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis* em cães de área rural no estado do Rio de Janeiro.** 2023.57p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O objetivo da presente pesquisa foi realizar uma análise epidemiológica a partir da detecção de *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis* através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) em amostras de sangue de cães domiciliados em sete municípios situados no estado do Rio de Janeiro. O estudo observacional transversal foi realizado para verificar a associação de fatores ambientais e do hospedeiro com a presença de DNA de *B. vogeli* e *E. canis* no sangue de cães provenientes dessas regiões, através de testes estatísticos como análise bivariada (Teste exato de Fisher) e análise multivariada com a construção de modelos preditivos para as infecções por *B. vogeli* e *E. canis*. Foram coletadas um total de 384 amostras de sangue de cães provenientes dos municípios de Seropédica, Paracambi, Piraí, Barra do Piraí, Barra Mansa, Pinheiral e Vassouras, localizados no estado do Rio de Janeiro. A partir da coleta de sangue, o material genético foi extraído e submetido à detecção de fragmentos específicos dos genes *Heat shock protein 70 kDa (hsp 70)* de *Babesia vogeli* e da subunidade ribossomal (16S rDNA) de *E. canis*, respectivamente, através da aplicação da técnica de qPCR. Um questionário epidemiológico foi elaborado e aplicado aos responsáveis dos cães, abordando fatores ambientais e características relacionadas ao hospedeiro que pudessem estar associados à ocorrência da infecção por *B. vogeli* e *E. canis*. Dentre os treze animais em que *B. vogeli* foi detectado, 5% (n = 2/40) pertenciam a Barra do Piraí, 5,27% (n=2/38) pertenciam a Barra Mansa, 10% (n=1/10) pertenciam a Paracambi, 3,77% (n=2/53) pertenciam a Piraí, 12% (n=3/25) pertenciam a Vassouras, 12,5% (n=1/8) pertenciam a Pinheiral e 16,6% (n=2/12) pertenciam a Seropédica. Enquanto dos 20 animais em que *E. canis* foi detectado, 5% (n=2/40) pertenciam a Barra do Piraí, 7,90% (n=3/38) pertenciam a Barra Mansa, 10% (n=1/10) pertenciam a Paracambi, 15,09% (n=8/53) pertenciam a Piraí, 8% (n=2/25) pertenciam a Vassouras, 25% (n=2/8) pertenciam a Pinheiral e 16,6% (n=2/12) pertenciam a Seropédica. Após a análise bivariada, observou-se que não houve associação das variáveis ( $p > 0.05$ ) estudadas com a detecção de *B. vogeli* e *E. canis* em cães de áreas rurais no estado do Rio de Janeiro. Contudo, a regressão logística demonstrou que cães que residem no mesmo ambiente apresentam três vezes mais chances de se infectarem com *E. canis* ( $OR = 3,52$ ; IC 1.21 – 10.24;  $p = 0.02$ ). A análise epidemiológica constatou que a presença de mais de um cão por propriedade é um fator relevante à infecção por *E. canis* na área alvo deste trabalho.

**Palavras-chave:** cão, epidemiologia, qPCR, área rural, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*.

## ABSTRACT

ELIAS, Rafaela Souza Abdo. **Epidemiologic analysis of *Babesia vogeli* and *Ehrlichia canis* in dogs in rural areas in the state of Rio de Janeiro.** 2023.57p. Dissertation (Master of Science, Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The objective of this research was to carry out a epidemiological analysis based on the detection of *Babesia vogeli* and *Ehrlichia canis* using the real-time PCR (qPCR) technique in blood samples from dogs domiciled in seven municipalities located in the state of Rio de Janeiro. The cross-sectional observational study was carried out to verify the association of environmental and host factors with the presence of *B. vogeli* and *E. canis* DNA in the blood of dogs from these regions, through statistical tests such as bivariate analysis (Fisher's exact test), and multivariate analysis with the construction of predictive models for *B. vogeli* and *E. canis* infections. A total of 384 blood samples were collected from dogs from the municipalities of Seropédica, Paracambi, Piraí, Barra do Piraí, Barra Mansa, Pinheiral and Vassouras, located in the state of Rio de Janeiro. From the blood collection, the genetic material was extracted and subjected to detection of specific fragments of the genes Heat shock protein 70 kDa (hsp 70) of *Babesia vogeli* and the ribosomal subunit (16S rDNA) of *E. canis*, respectively, through application of the qPCR technique. An epidemiological questionnaire was developed and applied to those responsible for the dogs, addressing environmental factors and characteristics related to the host that could be associated with the occurrence of infection by *B. vogeli* and *E. canis*. Among the thirteen animals in which *B. vogeli* was detected, 5% ( $n = 2/40$ ) belonged to Barra do Piraí, 5.27% ( $n=2/38$ ) belonged to Barra Mansa, 10% ( $n=1/ 10$ ) belonged to Paracambi, 3.77% ( $n=2/53$ ) belonged to Piraí, 12% ( $n=3/25$ ) belonged to Vassouras, 12.5% ( $n=1/8$ ) belonged to Pinheiral and 16 .6% ( $n=2/12$ ) belonged to Seropédica. While of the 20 animals in which *E. canis* was detected, 5% ( $n=2/40$ ) belonged to Barra do Piraí, 7.90% ( $n=3/38$ ) belonged to Barra Mansa, 10% ( $n=1/ 10$ ) belonged to Paracambi, 15.09% ( $n=8/53$ ) belonged to Piraí, 8% ( $n=2/25$ ) belonged to Vassouras, 25% ( $n=2/8$ ) belonged to Pinheiral and 16.6 % ( $n=2/12$ ) belonged to Seropédica. After bivariate analysis, it was observed that there was no association between the variables ( $p > 0.05$ ) studied and the detection of *B. vogeli* and *E. canis* in dogs from rural areas in the state of Rio de Janeiro. However, logistic regression demonstrated that dogs that live in the same environment are three times more likely to become infected with *E. canis* ( $OR = 3.52$ ; CI 1.21 – 10.24;  $p = 0.02$ ). The epidemiological analysis found that the presence of more than one dog per property is a relevant factor for *E. canis* infection in the target area of this work.

**Keywords:** dog, epidemiology, qPCR, rural area, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cPCR	PCR convencional
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
IC	Intervalo de Confiança
N	Número de cães
nPCR	<i>nested</i> PCR
OR	Odds Ratio
<i>p</i>	<i>p</i> -valor
pb	pares de base
qPCR	PCR em Tempo Real
SRD	sem raça definida
$\mu$ L	microlitro
$\mu$ M	micrômetro
mL	mililitro
°C	graus Celsius

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Primers para detecção molecular de espécies de <i>Babesia</i> em amostras de sangue de cães naturalmente infectados na região do Vale do Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	20
<b>Tabela 2.</b> Primers para detecção molecular de <i>Babesia vogeli</i> e <i>Ehrlichia canis</i> em amostras de sangue de cães naturalmente infectados na região do Vale do Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	20
<b>Tabela 3.</b> Análise bivariada dos fatores epidemiológicos que podem estar associados à presença de DNA de <i>Babesia vogeli</i> em cães no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	24
<b>Tabela 4.</b> Análise bivariada dos fatores epidemiológicos que podem estar associados à presença de DNA de <i>Ehrlichia canis</i> em cães no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	24
<b>Tabela 5.</b> Análise multivariada de fatores associados a presença de DNA de <i>E. canis</i> em cães, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Babesia vogeli</i> (ELIAS, R.S.A).....	6
<b>Figura 2.</b> Cão naturalmente infectado por <i>Rangelia vitalii</i> com orelhas sangrentas (SOARES et al., 2011).....	8
<b>Figura 3.</b> Eritrócitos parasitados por <i>Theileria anne</i> (GARCÍA, 2006).....	9
<b>Figura 4.</b> Ciclo biológico de <i>Ehrlichia canis</i> (ELIAS, R.S.A).....	12
<b>Figura 5.</b> Micrografia óptica de <i>Ehrlichia canis</i> , cepa Jaboticabal, no interior de um macrófago de um cão infectado experimentalmente. Fotografia de autoria da professora Dra. Machado, R. Z. (VIEIRA et al., 2010).....	12
<b>Figura 6.</b> Localização dos sete municípios da região do vale do Paraíba, onde foram realizadas as coletas: Seropédica, Paracambi, Piraí, Barra do Piraí, Pinheiral, Barra Mansa e Vassouras (Fonte: IBGE 2017/2023; Sistema de Coordenadas Geográficas SIRGAS 2000).....	14
<b>Figura 7.</b> Organograma do processo de coleta das amostras, apresentando a região selecionada e o número de amostras coletadas em cada um dos municípios.....	16
<b>Figura 8.</b> Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) do modelo preditivo de <i>Ehrlichia canis</i> em cães.....	27

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Piroplasmose canina: um breve panorama.....	4
2.1.1 <i>Babesia</i> sp.....	4
2.1.2 <i>Rangelia</i> sp.....	7
2.1.3 <i>Theileria</i> sp.....	9
2.2 Erliquiose monocítica canina.....	10
2.3 Aspectos epidemiológicos de parasitos que infectam cães .....	12
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Local de análises laboratoriais.....	14
3.2 Regiões selecionadas para a realização do estudo.....	14
3.3 Procedimentos para coleta.....	16
3.4 Determinação do número de amostras .....	16
3.5 Coletas de sangue e carapato.....	17
3.6 Aplicação do Questionário Epidemiológico.....	18
3.7 Identificação das espécies de carapatos.....	18
3.8 Processamento e armazenamento dos carapatos .....	19
3.9 Extração de DNA.....	19
3.10 Detecção molecular de <i>Babesia</i> spp. e <i>Ehrlichia canis</i> .....	20
3.11 Determinação do controle positivo.....	22
3.12 Sequenciamento.....	22
3.13 Medidas utilizadas para evitar contaminações.....	22
3.14 Análise Estatística.....	23
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>43</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, mudanças no meio ambiente (urbanização) e no clima, influenciaram na elevação do contato humano e de animais domésticos com a vida selvagem propiciando maior incidência e diversidade de infecções transmitidas por artrópodes principalmente carapatos (ALVARADO-RYBAK et al., 2016).

Desta forma, as doenças transmitidas por vetores causam um impacto relevante no bem-estar em animais de companhia, além de ocasionar riscos para saúde humana, pois alguns desses agentes apresentam potencial zoonótico. Regiões onde há uma grande biodiversidade, como na América do Sul, e pouco cuidado e proteção ambiental dessas áreas, contribuem para que ocorra uma intensificação e persistência de parasitos e vetores (MAGGI; KRÄMER, 2019).

As hemoparasitoses que acometem cães ao redor do mundo normalmente são ocasionadas por carapatos de diferentes espécies. De acordo com Berrada e Telford (2009), existem 800 espécies de carapatos descritas presentes em diversos lugares. Os três estágios (larva, ninfa e adulto) desse artrópode são capazes de infestar cães e são considerados os principais vetores de hemoparasitos em animais de estimação. Além disso, podem transmitir vírus, protozoários e bactérias – microrganismos causadores de inúmeras doenças.

Uma das principais patologias que acomete cães no mundo todo é a babesiose (SELIM et al., 2022), esta doença é ocasionada pelo protozoário *Babesia* pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e gênero *Babesia* (CATALDO et al., 2020) e, é capaz de infectar canídeos domésticos e selvagens (PASSOS et al., 2005). Esses parasitos intracelulares obrigatórios infectam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (VANNIER et al., 2015) e apresentam a forma de pera durante o período em que estão no interior dos eritrócitos de seus hospedeiros vertebrados (UILLENBERG, 2006).

O gênero *Babesia* é dividido em grandes espécies de *Babesia*, denominadas *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* (UILLENBERG, 2006) enquanto a pequena espécie de *Babesia* corresponde *B. gibsoni*, todas conhecidas pela capacidade de infectar cães (LEMOS et al., 2012). Sendo *B. vogeli*, no Brasil, a principal espécie de *Babesia* relatada em cães (TRAPP et al., 2004).

O protozoário *Babesia* é o responsável por ocasionar a doença hemolítica conhecida como babesiose canina que está distribuída no mundo todo e apresenta uma importância global significativa (BOOZER; MACINTIRE, 2003). Todas as espécies desse hemoparásito que são capazes de causar doença clínica em cães (CATALDO et al., 2020). *Babesia canis* se destaca por apresentar elevada prevalência em regiões de clima tropical e subtropical (TABOADA et al., 1992), enquanto *B. vogeli* é uma espécie cosmopolita transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (GARCÍA-QUESADA et al., 2021).

O artrópode *R. sanguineus* sensu lato atua como vetor de *B. vogeli*, e no intestino do hospedeiro invertebrado este protozoário realiza a etapa sexual (gametogonia), onde ocorre a fecundação do microgameta no macrogameta, dando origem ao oocineto. Os oocinetos serão liberados na hemocele do carrapato e, nas fêmeas desse ectoparasito, irão para o ovário, e se estabelecerão nos ovócitos, local onde ocorrerá o desenvolvimento desses oocinetos em novos carrapatos. Sendo assim, as larvas nascerão infectadas com esse parasito, pois os oocinetos irão se desenvolver em células que darão origem as glândulas salivares. Na glândula salivar irá acontecer a esporogonia, ocorrendo a produção dos esporozoítos, e estes serão liberados juntamente com a saliva do ixodídeo, durante o repasto sanguíneo, na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. No sangue do hospedeiro vertebrado este parasito se replica assexuadamente (merogonia) dentro dos eritrócitos, formando os merozoítos e completando seu ciclo biológico (CHAUVIN et al., 2009) e (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

Esta hemoparasitose tem importância veterinária (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) e apesar de não ter sinais específicos, alguns sinais clínicos são comuns, como anorexia, pirexia, epistaxe, petequias, esplenomegalia, anemia e trombocitopenia (BOOZER; MACINTIRE, 2003; SELIM et al., 2022). A gravidade da babesiose varia desde uma infecção subclínica até falência múltipla de órgãos e morte. As técnicas utilizadas para detecção das subespécies desse parasito ocorrem por análise de esfregaço sanguíneo e por meio de diagnóstico molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo possível distinguir as diferentes infecções ocasionadas por *Babesia* spp. (SALEM; FARAG, 2014).

Outra hemoparasitose recorrente é a erlioise monocítica canina, que é uma doença distribuída ao redor do mundo e é ocasionada pelo patógeno *Ehrlichia canis*, uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória e da ordem das Rickettsias (RAHAMIM et al., 2021). O gênero de *Ehrlichia* pertence à família Anaplasmataceae e contém algumas espécies patogênicas como *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii*, todas transmitidas por carrapatos ixodídeos (OJEDA-CHI et al., 2019). O principal vetor de *E.*

*canis* em cães é o *R. sanguineus* sensu lato, ectoparasito capaz de transmitir este patógeno por meio de repasto sanguíneo, e a presença de carrapatos competentes, assim como a de hospedeiros reservatórios são fatores que determinam onde a erliquiose ocorre com mais frequência. (VIEIRA et al., 2010).

No Brasil, *E. canis* demonstra altas taxas de prevalência em diferentes regiões do país (AGUIAR et al., 2019). A prevalência de infecção por *E. canis* varia de acordo com diversos fatores, mas normalmente correlacionados com o nível de exposição ao vetor infectado (DANTAS-TORRES et al., 2018). Cães e outros canídeos são hospedeiros naturais de *E. canis* e quando infectados por este parasito podem desenvolver uma doença febril e a infecção pode persistir por anos. Além disso, após um período de remissão a doença crônica grave pode progredir com febre, mal-estar, inapetência, perda de peso, linfadenopatia, membranas das mucosas pálidas, dor nas articulações, tendência a hemorragias, hiperglobulinemia e pancitopenia (EBANI et al., 2014).

Portanto, cães de área rural possuem acesso e contato com diferentes espécies de carrapatos e, consequentemente, estão sob risco de infecção por hemoparasitos dos gêneros *Babesia* e *Ehrlichia* e até mesmo de patógenos ainda não associados a cães. Devido a esses fatores, o presente estudo tem como objetivo investigar os fatores epidemiológicos associados a infecção por *B. vogeli* e *E. canis* em cães residentes em áreas rurais no Estado do Rio de Janeiro, utilizando ferramentas moleculares como nPCR e qPCR.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Piroplasmose canina: um breve panorama

Protozoários do filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Rangelia* e *Cytauxzoon* são responsáveis por ocasionar piroplasmose canina (OLIVEIRA et al., 2023). Esses hemoparasitos apresentam complexo apical, que os auxilia a penetrar nas células sanguíneas de seus hospedeiros vertebrados e, dentro dessas células adquirir um formato piriforme, morfologia que dá nome a ordem a qual pertencem (GHAURI et al., 2019).

Essa doença está presente em todo o mundo e é capaz de provocar grandes impactos na economia, medicina humana e veterinária. A piroplasmose é considerada a segunda maior hemoparasitose que infecta mamíferos ao redor do mundo (ALVARADO-RYBAK et al., 2016), assim como a infecção por *B. canis* é apontada como endêmica em regiões tropicais e subtropicais (GARCÍA, 2006). No Brasil, as espécies de piroplasma mais relatadas são *B. vogeli* e *B. gibsoni* (IRWIN, 2010), sendo a espécie *B. vogeli* considerada endêmica no país (OLIVEIRA et al., 2023).

Estudos anteriores realizados na América, Europa, África e Ásia demonstraram que a prevalência de cães infectados com o gênero *Babesia* varia de 0,1% a 75% enquanto a infecção por *Theileria* sp. varia de 0,1% a 15% e *Rangelia vitalii* tem prevalência de 5,8% a 30% de infecções e tem sido relatada na América do Sul como causadora de uma severa síndrome hemorrágica em cães. (INÁCIO et al., 2019). Contudo, no Brasil *R. vitalii* é descrita como sendo mais restrita as regiões sul e sudeste do país (LEMOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2023).

A piroplasmose é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa que compreende a ordem Piroplasmida (LEVINE et al., 1980). *Babesia* e *Theileria* são os dois principais gêneros de hemoparasitos transmitidos por carrapatos, os quais pertencem a ordem Piroplasmida (GHAURI et al., 2019).

#### 2.1.1 *Babesia* sp.

No fim do século dezenove, um médico Romeno descobriu a presença de microrganismos nas hemárias do gado e de ovelhas por meio de observação do sangue desses animais em microscópio. Esses microrganismos foram denominados de *Babesia bovis* e *Babesia ovis*, pertencentes ao gênero *Babesia*. Após um longo período, esses hemoparasitos morfológicamente similares a *Babesia* spp. observados em ruminantes foram descritos pela

primeira vez infectando eritrócitos de cães, na Itália. Porém, atualmente esse protozoário ocasiona doença em cães no mundo todo (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

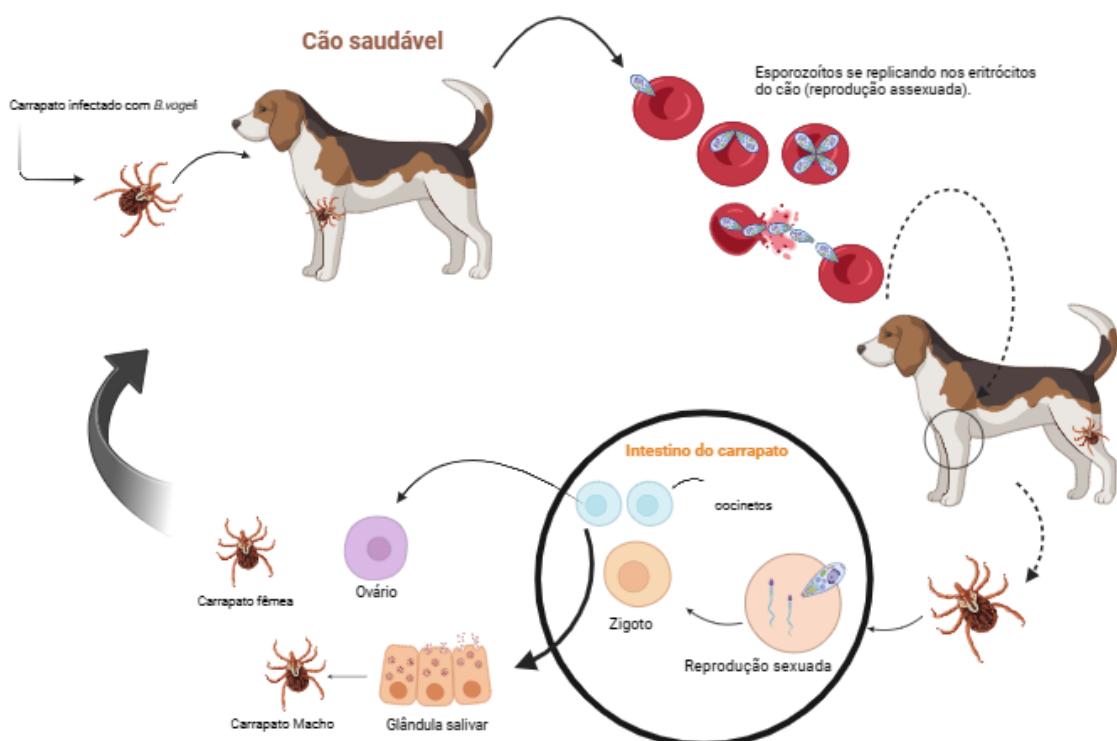
A babesiose canina é uma doença que é causada pelo protozoário do gênero *Babesia*, pertencentes a ordem Piroplasmida do filo Apicomplexa (CATALDO et al., 2020), e (FINIZIO et al., 2011). Apesar do agente etiológico *B. canis* ter distribuição ao redor do mundo, este parasito tem prevalência por regiões tropicais e subtropicais, alcançando a África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, Central e do Sul, enquanto *B. gibsoni* é mais frequente na Ásia e menos predominante na América do Norte, Oeste da África, Sul da Europa e Sul do Brasil (TRAPP et al., 2004).

O protozoário *Babesia* no Brasil está distribuído em diferentes regiões do país. A babesiose tem como vetor principal o carapato *R. sanguineus* sensu lato, esse parasito é capaz de infectar animais selvagens e domésticos (CATALDO et al., 2020). Além disso, a espécie mais recorrente desse parasito que acomete cães no Brasil é *B. vogeli*, porém *B. gibsoni* também já foi identificada através de microscopia óptica de esfregaço sanguíneo, onde é possível analisar as diferenças morfológicas das espécies de *Babesia* presentes no interior dos eritrócitos. Desta forma, designou-se os termos grande babesia para *B. canis* (3 a 5um) e pequena babesia para *B. gibsoni* (0.5 a 2.5um), (BOOZER; MACINTIRE, 2003). Entretanto, a prevalência de babesiose canina varia de acordo com cada região (TRAPP; MORAIS; VIDOTTO, 2004).

Os carapatos são os principais ectoparasitos de cães e possuem alta relevância na transmissão de patógenos (DANTAS-TORRES, 2008). O *R. sanguineus* sensu lato conhecido por parasitar cães domésticos pode ser encontrado em diversas partes do mundo, e no Brasil é o principal vetor de babesiose canina (PASSOS et al., 2005). Sendo assim, os vetores responsáveis pela transmissão de babesiose canina são os carapatos dos gêneros *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* e *Hyalomma* (GHAURI et al., 2019). Todavia, algumas subespécies de *Babesia* apresentam vetores específicos como é o caso de *B. canis* que é transmitido pelo carapato *Dermacentor reticulatus* e *B. vogeli* pelo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (CASSINI et al., 2009). Além disso, a forma de transmissão de *B. vogeli* ocorre diretamente através do repasto sanguíneo do carapato *R. sanguineus* sensu lato, enquanto *B. gibsoni* é transmitido por meio de sangue através da mordida de cães infectados com o parasito, transfusões de sangue e suprimento transplacentário (MAGGI; KRÄMER, 2019).

O gênero *Babesia* apresenta um ciclo heteroxeno, onde o carapato é o hospedeiro definitivo (reprodução sexuada) e o cão é o hospedeiro intermediário (reprodução assexuada, Figura 1).

O hospedeiro definitivo, ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro intermediário inocula, através da saliva, esporozoítos no sangue desse cão. Esses esporozoítos penetram nos eritrócitos e se replicam assexuadamente, produzindo novas estruturas denominadas merozoítos. Esses merozoítos ao serem liberados na corrente sanguínea irão infectar novas hemácias. Desta forma, os merozoítos ao serem ingeridos pelos carrapatos, durante seu processo de alimentação, irão atingir as células intestinais onde ocorrerá a reprodução sexuada, dando origem aos oocinetos. No caso de carrapatos fêmeas esses oocinetos irão para o ovário e se estabelecerão nos ovócitos, no desenvolvimento desses ovócitos em novos carrapatos, o protozoário se desenvolve em células que irão originar as glândulas salivares, sendo assim, as larvas de carrapato nascerão infectadas com o parasito. Entretanto, essas larvas apesar de estarem infectadas só conseguirão infectar o hospedeiro vertebrado quando chegarem a fase de ninfa, pois é nessa etapa de desenvolvimento que o parasito estará disponível na glândula salivar do carrapato na forma de esporozoíto – forma infectante (CHAUVIN et al., 2009). Todavia, de acordo com Irwin (2010), o carrapato *R. sanguineus* sensu lato é capaz de transmitir *B. vogeli* em todos os seus três estágios de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Babesia vogeli*. (Fonte: Acervo Pessoal).

A babesiose canina pode provocar o desenvolvimento de anemia hemolítica e/ou trombocitopenia, além de outros sinais clínicos como anorexia, febre, esplenomegalia, icterícia e pigmentúria (CASSINI et al., 2009). A seriedade da doença varia de uma infecção subclínica a falência múltipla dos órgãos e morte. Um fator determinante no nível de patogenicidade da doença são as diferentes espécies de *Babesia* que infectam o hospedeiro vertebrado, porém outros fatores como idade, coinfeções com outros patógenos e o estado imunológico do animal também influenciam no desenvolvimento da doença (IRWIN, 2010).

A doença se manifesta em cães de todas as idades, todavia, a forma mais grave ocorre em filhotes (ALMAZÁN et al., 2022), onde a severidade da babesiose canina não está relacionada apenas com o grau de parasitemia pois, mesmo em fases agudas da infecção a parasitemia permanece baixa. Sendo assim, os prejuízos ocasionados pelo parasita provocam uma anemia devido à combinação de hemólises intravascular e extravascular que propicia a ruptura das hemácias devido ao aumento da fragilidade osmótica das células (IRWIN, 2010).

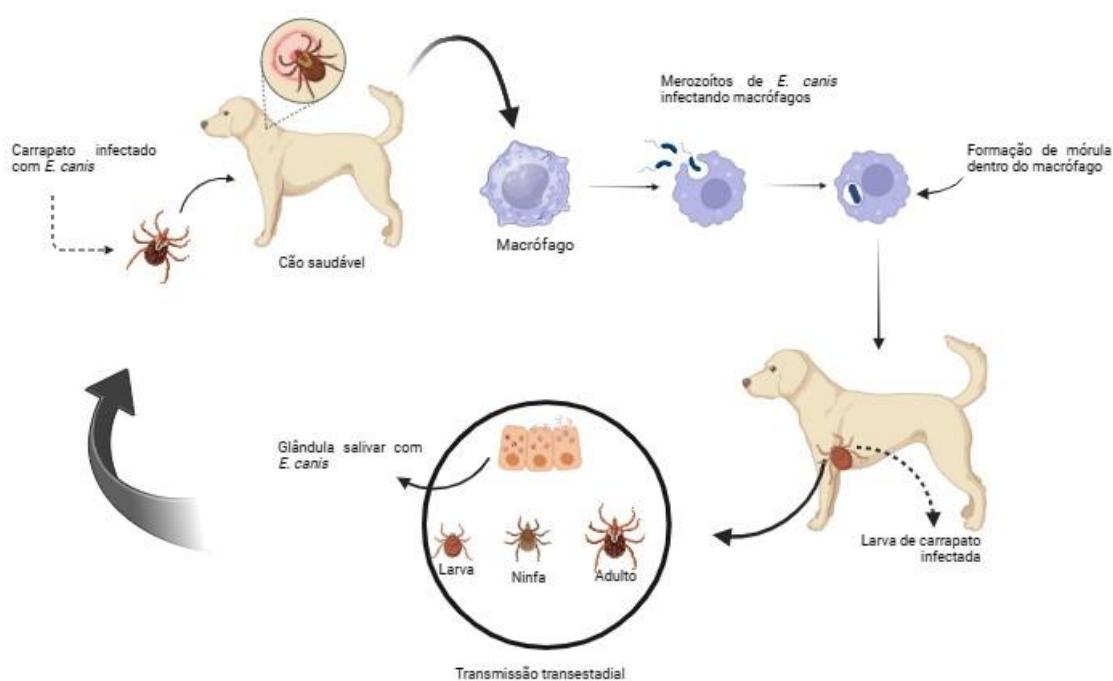
Portanto, a patogenicidade ocasionada por *Babesia* pode ser considerada séria ou não de acordo com os sinais clínicos que o cão apresenta. Na babesiose canina leve o animal apresenta manifestações de anemia moderada, fraqueza, febre e icterícia enquanto a forma grave da doença os sinais clínicos não podem ser caracterizados apenas pela hemólise dos eritrócitos, mas sim por disfunção de um ou mais órgãos e morte (IRWIN, 2010).

## 2.2. Erliquiose monocítica canina

A erliquiose monocítica canina é uma doença que está amplamente distribuída no mundo todo, porém ocorre com mais frequência em regiões tropicais e subtropicais (ARROYAVE et al., 2020). O patógeno causador dessa doença é a *Ehrlichia*, uma bactéria gram-negativa, pleomórfica e intracelular obrigatória. O gênero *Ehrlichia* pertence à família *Anaplasmataceae*, da ordem das Rickettsias (DUMLER et al., 2001), esse gênero inicialmente incluía dez espécies, porém, foi reorganizado e atualmente apresenta cinco espécies, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia Chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia ruminantium*, e o restante dos organismos foi reclassificado para o gênero *Anaplasma*. Este parasito foi descrito pela primeira vez por Donatien e Letsquord (1935) durante a guerra do Vietnã, quando uma doença levou a óbito vários cães da raça Pastor Alemão, que trabalharam para as forças armadas no período da guerra (VIEIRA et al., 2010).

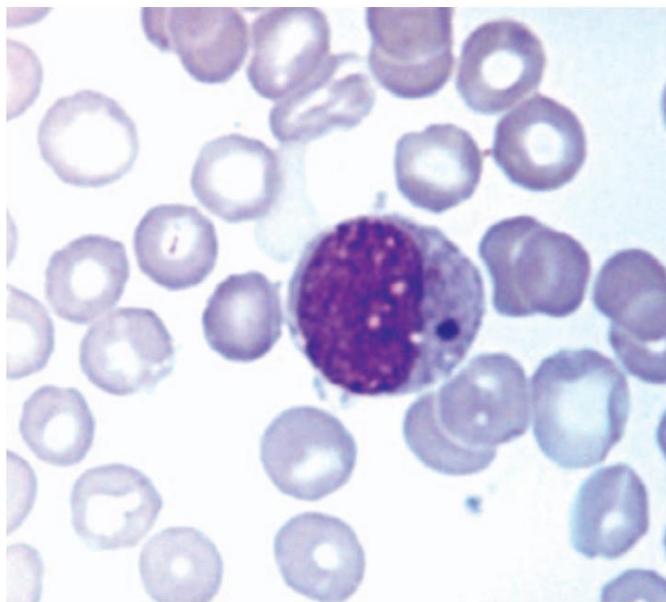
Esta bactéria é transmitida aos cães por diferentes espécies de carrapatos como o *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus sanguineus*,

*Haemaphysalis yensi* e *Dermacentor variabilis*, entretanto o *R. sanguineus* é considerado o principal vetor de *Ehrlichia*. O carapato se infecta com *E. canis* quando realiza o repasto sanguíneo do sangue de cães infectados. Este parasito dentro do hospedeiro invertebrado irá se multiplicar nos hemócitos e nas células da glândula salivar, caracterizando a transmissão como transestadial, capaz de transmitir o patógeno de larva para ninfa e para o adulto do carapato (Figura 4).



**Figura 4.** Ciclo biológico de *Ehrlichia canis* (Fonte: Acervo Pessoal).

Durante a fase aguda da doença alguns sinais clínicos como febre, depressão, letargia, anorexia, linfoadenomegalia, esplenomegalia e tendências hemorrágicas (normalmente ocorre exibição de petequias dérmicas, equimoses e epistaxe). Além disso, lesões oftalmológicas também são frequentes e incluem uveíte anterior, coriorretinite, papiledema, hemorragia retiniana, presença de infiltrados perivasculares da retina e deslocamento bolhoso da retina (NAVARRETE et al., 2022).



**Figura 5.** Micrografia óptica de *Ehrlichia canis*, cepa Jaboticabal, no interior de um macrófago de um cão infectado experimentalmente. Fotografia de autoria da professora Dra. Machado, R.Z. (VIEIRA et al., 2010).

### 2.3 Aspectos epidemiológicos de parasitos que infectam cães

Na América latina, a babesiose em animais de estimação é causada principalmente pelas espécies *B. vogeli* e *B. gibsoni*. Há muitos relatos dessa doença na América do Sul enquanto na América Central as informações são escassas (MAGGI; KRÄMER, 2019). Países como Paraguai, Uruguai, Venezuela, Argentina, Equador e Colômbia também relataram casos de cães infectados com *Babesia* spp. A frequência de *B. vogeli* em cães no Paraguai é de 5.5 %, na Argentina de 3% a 7% e na Colômbia 5.4% (INÁCIO et al., 2019).

O parasito *Rangelia vitalii* é o responsável por ocasionar rangeliose em canídeos selvagens e domésticos. Essa doença é negligenciada e ocorre principalmente no cone sul da América do Sul (SOUZA et al., 2019). A prevalência do parasito *R. vitalii* em cães do Paraguai é de 4%, um percentual menor do que o ocorrido no Brasil (6.8% a 30%), esse hemoprotezoário também infecta cães na Argentina e Uruguai (INÁCIO et al., 2019).

O protozoário *Theileria* sp. pode causar theileriose canina e, é uma doença que ocorre em países da Europa (Croácia, França, Portugal e Espanha) e África do Sul (ROSA et al., 2014). As espécies de *Theileria* sp. que foram relatadas infectando cães são *Theileria annulata*, *Theileria equi* e *Theileria annae*. Esses parasitas, apesar de não apresentarem sinais clínicos específicos, são capazes de provocar anemia, esplenomegalia e síndrome imunomediada. Na Croácia, 3% de cães sintomáticos testaram positivo para *T. annae* através de teste de

PCR (DIXIT; VARSHNEY, 2010). Desta forma, de acordo com Salim et al. (2019) cães são suscetíveis à infecção por *T. equi* e *Theileria* spp. e, apesar de não apresentarem sinais clínicos específicos para theileriose podem atuar como reservatórios desse hemoparasita.

A bactéria intracelular obrigatória *E. canis* é a responsável por ocasionar erliquiose monocítica canina (VIEIRA et al., 2022), no Brasil essa doença é muito comum, principalmente em lugares onde cães são altamente expostos ao carrapato marrom do cão, estudos conduzidos em várias regiões do país indicam que a prevalência de infecção por *E. canis* em cães é de 0.7% a 50% (DANTAS – TORRES et al., 2018). Enquanto que no México a soroprevalência nacional desse patógeno varia de 33.1% a 74.3% (OJEDA-CHI et al., 2019). Em Cuba uma pesquisa realizada em quatro municípios da região oeste do país, mostrou que há uma prevalência de 47.4% de cães infectados por *E. canis* (NAVARRETE et al., 2022).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto foi submetido a avaliação pela Comissão de Ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) sob registro de número 3915240616.

#### **3.1 Local de análises laboratoriais**

As análises laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP), pertencente ao Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica – RJ, Brasil.

#### **3.2 Regiões selecionadas para a realização do estudo**

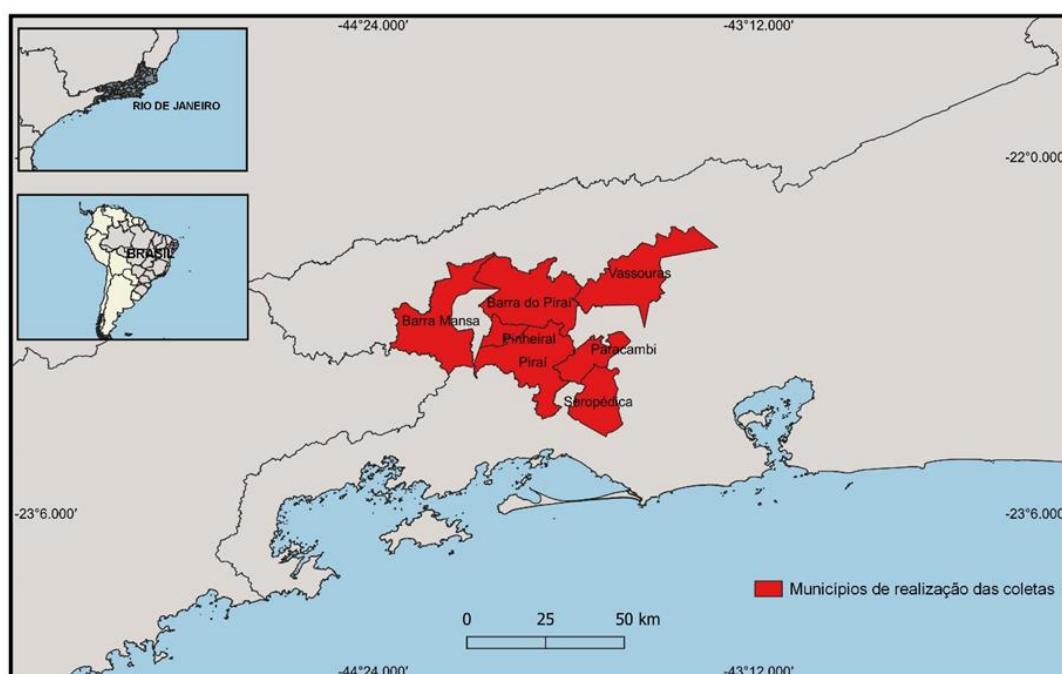
O referido estudo foi realizado em sete municípios pertencentes ao do Estado do Rio de Janeiro: Seropédica, Paracambi, Piraí, Pinheiral, Barra do Piraí, Barra Mansa e Vassouras (Figura 6). Essa região foi selecionada por atender os critérios estabelecidos para a execução deste trabalho, sendo uma localização que apresenta reservas naturais importantes, como a Serra da Mantiqueira e reduto de Mata Atlântica. Além de ficar situada próximo a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde ocorreu o desenvolvimento da pesquisa.

O município de Seropédica está situado na baixada fluminense, Sul do Estado do Rio de Janeiro, encontra-se a 36 metros de altitude e apresenta as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 22° 44' 29" Sul, Longitude: 43° 42' 19" Oeste. Seropédica está localizada a 75 quilômetros da capital do Estado e boa parte da economia local gira em torno da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e da comunidade universitária, porém a cidade também conta com um polo industrial instalado as margens da BR 116 que se destina a empresas de médio e grande porte como a Usina Termelétrica Barbosa Lima Sobrinho e a alimentícia Panco.

Barra do Piraí está situado na região Sul do Estado, a 22° 28' 12" de latitude sul e 43° 49' 32" de longitude oeste. Encontra-se a uma distância aproximada de 100 quilômetros da capital. As atividades econômicas do município são baseadas na agricultura, metalurgia, pecuária e comércio (PIRAÍ, 2015). O município de Paracambi está situado na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro e apresenta latitude de 22° 36' 39" sul e longitude de 43° 32' 33" oeste e está a 50 metros de altitude e 81 quilômetros da capital do Estado. A cidade faz parte da região do Vale do Café, sendo uma cidade histórica e com característica industrial devido ao surgimento da indústria têxtil na região. Piraí faz parte do Vale do Paraíba

Fluminense (médio Paraíba), está situado a 373 metros de altitude e apresenta latitude  $22^{\circ} 38' 1''$  sul e longitude  $43^{\circ} 54' 17''$  oeste. A economia da cidade é baseada na agricultura, pecuária, silvicultura, pesca, indústria, produção e distribuição de eletricidade, construção civil e prestação de serviços, além de possuir três condomínios industriais e abriga grandes empresas na região. Barra Mansa é um município pertencente a região imediata de Volta Redonda e está localizado a 381 metros de altitude. Apresenta latitude  $22^{\circ} 32' 39''$  sul e longitude  $44^{\circ} 10' 17''$  oeste, a economia da cidade apresenta um setor industrial em crescimento de micro e pequenas empresas além de contar com os setores primário, secundário, terciário e de turismo na região. O município de Pinheiral também fica localizado no Vale do Paraíba Fluminense e encontra-se a uma latitude de  $22^{\circ} 30' 46''$  sul e longitude  $44^{\circ} 00' 02''$  oeste, estando a uma altitude de 345 metros. A economia da cidade é baseada na agropecuária e contém pequenas indústrias de transformação.

O município de Vassouras encontra-se localizado no Centro-Sul do Estado do Rio de Janeiro, apresenta uma altitude de 434 metros e latitude de  $22^{\circ} 24' 14''$  sul e longitude de  $43^{\circ} 39' 45''$  oeste. É uma cidade histórica e turística e a economia é baseada na agropecuária, comércio, turismo, horticultura, pecuária e equinocultura (VASSOURAS, 2018).



**Figura 6:** Localização dos sete municípios da região do vale do Paraíba, onde foram realizadas as coletas: Seropédica, Paracambi, Piraí, Barra do Piraí, Pinheiral, Barra Mansa e Vassouras (Fonte: IBGE 2017/2023; Sistema de Coordenadas Geográficas SIRGAS 2000).

### **3.3 Procedimentos para coleta**

As coletas foram realizadas no período de março de 2022 a março de 2023, nas áreas rurais dos sete municípios da região do Vale do Paraíba. As propriedades foram escolhidas de modo aleatório e as amostras coletadas tiveram a autorização dos tutores dos animais que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). Os tutores foram devidamente informados e instruídos sobre a realização do projeto e foi solicitado a cada um deles uma entrevista por meio de um questionário epidemiológico (Anexo B).

### **3.4 Determinação do número de amostras**

Foram considerados parâmetros segundo Thrusfield (2007), o qual estabelece grau de confiança de 95%, 5% de precisão e uma prevalência esperada de 50%. O cálculo amostral foi desenvolvido aplicando a fórmula a seguir:

$$N = \frac{1,962 \times P (1-P)}{d^2}$$

Onde:

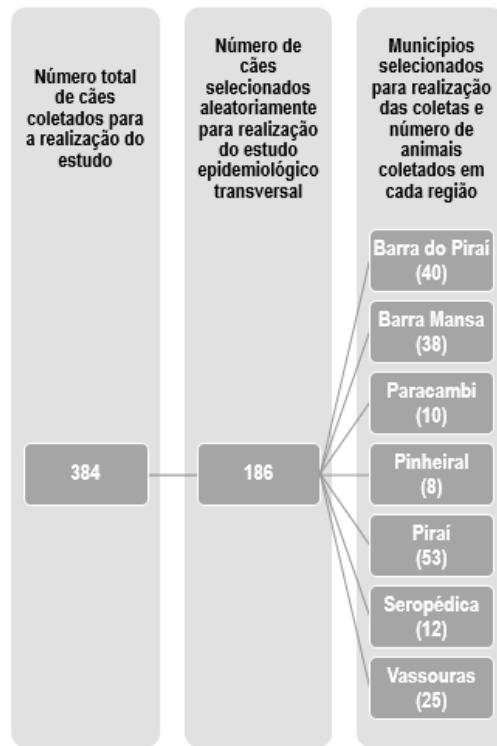
N = Número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita

P = Prevalência esperada

1,962 = fator determinante do grau de confiança

d = erro amostral

De acordo com a fórmula o número amostral mínimo para um estudo epidemiológico é 384. Desta forma, foram coletadas amostras de sangue de 384 cães de 186 propriedades rurais visitadas (Figura 7), todos esses animais foram devidamente inspecionados e avaliados fisicamente. Porém, para a realização do estudo epidemiológico deste trabalho utilizou-se o método de sorteio aleatório onde foram selecionados um cão por propriedade, tal fato foi necessário em decorrência do baixo número de propriedades encontradas em área rural.



**Figura 7:** Organograma do processo de coleta das amostras, apresentando a região selecionada e o número de amostras coletadas em cada um dos municípios.

Durante o período de um ano diversas propriedades rurais, dentre estas fazendas, sítios e chácaras com produção de gado de leite e gado de corte foram visitados a fim de se obter a amostragem de cães necessária para a realização deste trabalho. Sendo assim, do total de 99 propriedades de gado de leite, 93 possuíam cães e apenas seis propriedades não continham cães. Já das 12 propriedades de criação de gado de corte, somente duas possuíam cães.

### 3.5 Coletas de sangue e carrapato

Amostras de sangue de cães foram coletadas a partir de venopunção cefálica, acondicionadas em tubos contendo EDTA, devidamente identificados, e mantidas sob refrigeração em caixa térmica até chegar ao laboratório. Durante inspeção dos animais, carapatos encontrados em diferentes estágios de vida (larva, ninfa e/ou adultos) foram coletados e armazenados em recipientes plásticos. No laboratório, todas as amostras obtidas foram armazenadas em freezer à – 20°C. Os animais e ambientes foram examinados com o intuito de detectar carapatos. A retirada dos artrópodes em cada cão foi realizada manualmente e durava aproximadamente 15 minutos e, quando necessário era utilizado pinça hemostática para auxiliar na remoção do ectoparasita. O ambiente também era inspecionado pelo mesmo período. Para coletar os carapatos encontrados no ambiente utilizou-se o método de arraste

com o auxílio de uma flanela branca, em seguida esses artrópodes também foram armazenados em recipientes de plásticos vedados e guardados em isopor com gelo até que as amostras fossem devidamente triadas e armazenadas em freezer à – 20°C.

### **3.6 Aplicação do Questionário Epidemiológico**

Foi realizada uma entrevista com cada um dos tutores responsáveis pelos animais que participaram do estudo através de um questionário epidemiológico semiestruturado (Anexo B), considerando: presença de mata (Sim/Não), quantidade de cães na propriedade (um cão/ mais de um cão), controle de carapato (Sim/Não), gato (presença/ausência), bovino (presença/ausência), equino (presença/ausência), gambá (sim/não), roedores (sim/não), silvestres (presença/ausência), sexo (Macho/Fêmea), idade (>1 ano/<1 ano), raça (SRD/RD), cor (pelagem clara, pelagem escura), porte (pequeno e médio/grande), castrado (sim/não), escore corporal (magro ou normal/ acima do peso), pelo (curto/ médio e longo), contato direto com animais (sim/não), uso de medicamento (sim/não), uso de vermífugo (sim/não), tempo de vermiculação (até 3 meses/ mais de 3 meses), ectoparasita (sim/não), carapato (ausência/presença), infestação de carapato (baixa/ média e alta), pulgas (presença/ausência), piolhos (presença/ausência), sarna (presença/ausência), hábito do animal (preso/solto).

Nas propriedades visitadas todos os cães residentes foram avaliados, inspecionados para observação de lesões, escore corporal e presença de ectoparasitos. A análise do estado físico do animal ocorreu por meio de uma avaliação física no momento da coleta de carapatos, o objetivo foi verificar se o animal apresentava algum sinal clínico referentes a frequência cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar e temperatura.

### **3.7 Identificação das espécies de carapatos**

Todos os carapatos obtidos em cães e no ambiente, foram identificados morfológicamente através de estereomicroscópio utilizando chave taxonômica descrita por Barros-Battesti et al. (2005). Os estágios ninfas de carapatos do gênero *Amblyomma* foram identificados através da chave taxonômica para espécie descrita por Martins et al. (2010). Os estágios de larva dos carapatos do gênero *Amblyomma* foram identificados por meio da técnica de PCR-RFLP conforme descrito por Paiva (2019). Os carapatos do Gênero *Rhipicephalus* nos estágios de larva, ninfa e adulto foram identificados morfológicamente por meio da chave taxonômica para a espécie descrita por Leitreile (1806), (NAVA et al., 2015).

### **3.8 Processamento e armazenamento dos carrapatos**

As larvas, ninfas, fêmeas não ingurgitadas e machos passaram por um processo de limpeza para remover eventuais sujidades, sendo imersos em uma solução de hipoclorito à 0,2% e depois em uma solução de PBS 1x/soro fisiológico e então armazenados em tubos de polipropilenos de 1,5 mL contendo 50 $\mu$ L de RNA later (invitrogen – Thermo Fisher Scientific) e em seguida foram armazenados no freezer à -20°C.

As fêmeas ingurgitadas foram limpas pelo mesmo processo e então dissecadas. Seus órgãos (intestino, ovário e glândula salivar) foram separados, lavados com PBS 1x/soro fisiológico armazenados individualmente em RNA later (invitrogen – Thermo Fisher Scientific) até a extração do material genético.

### **3.9 Extração de DNA**

A extração de DNA das amostras de sangue coletadas foi realizada por meio de extração magnética, através do equipamento denominado Extracta 16, fabricado pela Loccus do Brasil Ltda. Esse aparelho possui um sistema automatizado que realiza o procedimento de extração através do uso de *beads* magnéticas, o que garante mais praticidade e redução das chances de erro de pipetagem, além de promover uma amostra livre de impurezas. A Extracta 16 apresenta alto desempenho e celeridade, pois permite que sejam processadas até 16 amostras em um período de aproximadamente 40 minutos, sem a necessidade da manipulação constante de um usuário para executar o processo.

Para realizar a extração de sangue foi utilizado um kit específico que acompanha o equipamento. Esse kit é constituído de uma placa de 96 poços, contendo reagentes específicos para cada etapa do processo de extração, no qual foram adicionados 230 $\mu$ L de sangue sem plasma nas colunas 1 e 7 da placa, 20 $\mu$ L de proteinase K e 60 $\mu$ L do reagente LS3. Posteriormente, a placa foi inserida no aparelho, onde ocorreu todo o processo de extração de DNA de forma automatizada.

Ao final da extração, a placa foi retirada do aparelho e nas colunas 6 e 12 coletou-se 90 $\mu$ L de DNA extraído e eluído. O volume final de DNA foi armazenado em alíquotas de 30 $\mu$ L em tubos Eppendorf de 1,5mL e estocado em freezer a -80°C.

### **3.10 Detecção molecular de *Babesia* spp. e *Ehrlichia canis***

A detecção molecular de espécies de *Babesia* spp. foi realizada através de dois ensaios de PCR. Para a  $\mu$ L realização da *nested* PCR utilizou-se os primers externos BTF1

(5' GGCTCATTACAACAGTTATAG 3') e BTR1 (5' CCCAAAGACTTG ATTTCTCTC 3') que amplificam um fragmento de 930bp da sequência do gene 18S rRNA das espécies de *B. gibsoni*, *B. conrodae*, *B. canis canis*, *B. vogeli*, *B. rossi*, *Babesia* sp., *T. annae*, *T. equi*, e um segundo par de primers internos BTF2 (5' CCGT GCTAATTGTAGGGCTAATAC 3') e BTR2 (5' GGACTACGACGGTATCTGATCG 3') que amplificam um fragmento de 800bp também da sequência 18S rRNA para as mesmas espécies do par de primers BTF1 e BTR1. A primeira reação de PCR (BTF1 e BTR1) foi realizada em um volume total de 25 $\mu$ L contendo 2,5 $\mu$ L (1x) de 10x PCR, tampão [Tris – Cl 100Mm (Ph9), KCl 500mM, Triton 1% x-100], 1,5 $\mu$ L (3mM) de MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM de cada um dos quatro desoxinucleotídeos trifosfatos, 1U Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), 20pmol de cada primer e 3 $\mu$ l (100ng/ $\mu$ L) de DNA. As condições de termociclagem 94°C por 3 minutos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidas por 45 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma etapa final a 72°C por 7 minutos. A segunda reação de PCR (BTF2 e BTR2) também foi realizada em um volume total de 25 $\mu$ L contendo  $\mu$ L1X de 10x PCR, tampão [Tris – Cl 100Mm (Ph9), KCl 500mM, Triton 1% x-100],  $\mu$ L3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM de DNTP, 1U Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA) e 20pmol de cada primer e 3 $\mu$ l (100ng/ $\mu$ L) de DNA. As condições de termociclagem 94°C por 3 minutos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidas por 45 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma etapa final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados serão visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e observados por iluminação UV (JEFFERIES et al., 2007).

Para detecção molecular de espécies de *Babesia vogeli* foram usados os primers BvqF (5' GCTGGTGACACCCACCTT 3') e BvqR (5' GGCACGCTTGTGGTC 3') que amplificam um fragmento de 118bp da sequência de gene *hsp70* para espécie *B. vogeli*, estes primers foram sintetizados pela Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume total de 12 $\mu$ L contendo TaqMan universal PCR Master mix (1x), 0,90uM de cada primer, 0,25uM de sonda e 2 $\mu$ l (100ng/ $\mu$ L) de DNA. As condições de termociclagem 95°C por 10 minutos seguidas por 40 ciclos a 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto (PAULINO et al., 2018). Todas as reações foram desempenhadas em duplicada.

A detecção molecular da espécie *Ehrlichia canis* foi realizada por meio de ensaios de PCR, onde foram utilizados os primers Baneth-F5 (5' TATAGCCTCTGGCTATAGGAAATT GTTA 3') e Baneth-R5 (5' ACCATTCTAATGGCTATTCCGTACTA 3') que amplificam um fragmento de 93bp da sequência de gene 16S rRNA estes primers foram sintetizados pela invitrogen (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e sonda também sintetizada pela Invitrogen (Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume total de 12 $\mu$ L contendo 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 0,90uM de cada primer, 0,25uM de sonda e 3 $\mu$ l (100ng/ $\mu$ L) de DNA. As condições de termociclagem 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (BANETH et al., 2009). Todas as reações foram desempenhadas em duplicata.

**Quadro 1. Primers para detecção molecular de *Babesia* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados na Região do Vale do Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.**

Primers	Sequências 5'- 3'	Fragmento	Referência
BTF1	GGCTCATTACAAACAGTTATAG		
BTR1	CCCAAAGACTTGATTCTCTC	930pb	
BTF2	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC		Jefferies; Ryan; Irwin, 2007
BTR2	GGACTACGACGGTATCTGATCG	800pb	
SONDA	6-FAM-CCTCCTCGTTGAGCACT-MGB		

**Quadro 2. Primers para detecção molecular de *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados na Região do Vale do Paraíba, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.**

Primers e sondas	Sequências 5'- 3'	Fragmento	Referência
BvqF	GCTGGTGACACCCACCTT		
BvqR	GGCACGCTTGTGGTC	118pb	Paulino et al., 2018
Baneth-F5	TATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTGTTA		
Baneth-R5	ACCATTCTAATGGCTATTCCGTACTA	93 pb	Baneth et al., 2009
SONDA	6-FAM-TGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGTAMRA		

### **3.11 Determinação do controle positivo**

Os controles positivos utilizados em cada uma das reações foram obtidos através de amostras de DNA de sangue de cães que apresentaram inclusão para *B. vogeli* e presença de mórulas em macrófagos e leucócitos para *E. canis* visualizadas em esfregaço sanguíneo por meio de microscópio óptico e confirmadas a partir de técnicas moleculares específicas para a detecção do referido agente. O PCR foi confirmado por meio das sequências de *B. vogeli* - BvqF (5' GCTGGTGACACCCACCTT 3') e BvqR (5' GGCAC GCTTGTGGTC 3') e *E. canis* Baneth-F5 (5' TATAGCCTCTG GCTATAGGAAATTGTTA 3') e Baneth-R5 (5' ACCATTCTAATGGCTATTCCGTACTA 3') sequenciamento SANGER e as sequências obtidas estão disponíveis no GenBank.

### **3.12 Sequenciamento**

Os primers que amplificaram as sequências da 18S rRNA para *Babesia* spp. de amostras de sangue de cães foram purificados com kit ExoSAP sintetizados pela Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando 10µL do produto da nPCR com 4µL do reagente ExoSAP (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), totalizando um volume de 14µL. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos para degradar os primers e nucleotídeos restantes. Posteriormente ocorreu incubação a 80°C por 10 minutos para inativar o reagente ExoSAP. Após a purificação no aparelho de termociclagem (ProFlex) foram adicionados 5µL de cada amostra em novo tubo e 2,5µL de solução de primer forward e 2,5µL de solução de primer reverse, em cada uma das amostras, sendo o volume final de 10µL. Por fim, o produto de PCR estava pronto para ser usado no sequenciamento de DNA.

As amostras purificadas seguindo as instruções do fabricante foram sequenciadas. O sequenciamento foi realizado pelo método SANGER no Instituto Oswaldo Cruz.

### **3.13 Medidas utilizadas para evitar contaminações**

Com o objetivo de obter resultados claros e satisfatórios optou-se por adotar algumas medidas com o intuito de evitar contaminações. A preliminar higienização do fluxo laminar e da capela utilizados no experimento foi feito a base de álcool 70% e em seguida esterilizado à luz UV ultravioleta por 15 minutos, também foram utilizadas ponteiras com filtro, assim como sua apropriada substituição em cada uma das etapas das reações. Os reagentes usados nas técnicas de qPCR e nPCR foram devidamente manuseados com luvas nitrílicas descartáveis e em ambientes estéreis, livres de qualquer possível contaminação.

### **3.14 Análise estatística**

Todos os dados estatísticos gerados a partir deste estudo foram realizados no ambiente R (versão 3.6.1), (Copyright © 2017 The Foundation for Statistical Computing) com o objetivo de avaliar a associação individual para cada uma das variáveis com a positividade para *B. vogeli* e *E. canis* na qPCR. A princípio, as amostras positivas e negativas foram correlacionadas em uma planilha desenvolvida no Excel, em nível dicotômico qualitativo (onde positivo = 1 e negativo = 0) e importada para o ambiente R. Posteriormente, foi construída uma análise bivariada através do Teste Exato de Fisher. Em seguida, as variáveis foram submetidas à diferentes combinações para a construção de modelos preditivos utilizando a ferramenta *step wise* no pacote “modelo lineares generalizados” (glm) que se baseia na escolha do menor valor do critério de Akaike (Bozdogan, 1987). A colinearidade entre as variáveis independentes foi verificada de acordo com Menard (1995), assumindo o valor de tolerância >0,1 e Fator de Inflação de Variância (VIF). O modelo final foi escolhido de acordo com o melhor valor de performance (índice C) e ajuste estabelecida pelo teste de Hosmer-Lemeshow. O teste de Mcnemar que apresenta nível de significância de 5% foi utilizado como forma de mensurar as proporções de discordância entre o qPCR e Cpcr objetivando o gene *hsp70* assim como verificar o desempenho das sequências 16S Rdna e *hsp70* para detecção molecular de *B. vogeli* (MEDRONHO, 2009).

#### **4 RESULTADOS**

Do total de 186 amostras, 13 estavam positivas para *B. vogeli* e 20 positivas para *E. canis*, demonstrando uma frequência de 6,99% (13/186) para *B. vogeli* e prevalência de 10,75% (n=20/186) para *E. canis*. Realizou-se também a frequência de *B. vogeli* e *E. canis* em cada um dos municípios eleitos para compor este estudo, em Barra do Piraí foram selecionados sangues de 40 cães dos quais 5 % (n= 2/40) apresentaram positividade para *B. canis* e 5% (n=2/40) para *E. canis*. Na região de Barra Mansa foram colhidas 38 amostras e 5,27% (n=2/38) dos animais estavam positivos para *B. vogeli* e 7,90% (n=3/38) para *E. canis*, em Paracambi coletou-se 10 amostras de sangue e obteve-se 10% (n=1/10) de cães positivos para *B. vogeli* e 10% (n=1/10) para *E. canis*, enquanto que no município de Piraí foram coletadas 53 amostras de sangue e 3,77% (n=2/53) encontravam-se positivas para *B. vogeli* e 15,09% (8/53) para *E. canis*, por fim em Vassouras coletou-se 25 amostras de sangue e 12% (n=3/25) dos cães apresentaram-se positivos para *B. vogeli* e 8% (n=2/25) para *E. canis*, em Pinheiral 8 amostras de sangue foram coletadas e 12,5% (n= 1/8) estavam positivas para *B. vogeli* e 25% (n=2/8) para *E. canis* e em Seropédica foi possível obter 12 amostras de sangue, sendo 16,6% (n=2/12) positivas para *B. canis* e 16,6% (n= 2/12) para *E. canis*.

Junto com as amostras de sangue coletadas de cães de área rural da região do Vale do Paraíba também foram coletados carapatos desses animais e do ambiente em que viviam, totalizando 1006 carapatos pertencentes aos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*. Desta forma, foram obtidos 526 carapatos de *Amblyomma* spp. e uma frequência de 35,04% (n=526/1.006) desse gênero, enquanto foram adquiridos 480 carapatos *Rhipicephalus* e uma frequência 31,98 % (n= 480/1.006) desse gênero. Neste estudo foram adquiridos ixodídeos de várias espécies como *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Amblyomma sculptum* (6 machos), *Amblyomma brasiliense* (1 fêmea) e *Amblyomma tigrinum* (01 macho) e nos três estágios de desenvolvimento, larva, ninfa e adulto.

Além de averiguar e identificar a presença de ectoparasitos como carapatos e pulgas outros parasitos como piolhos e ácaros causadores de sarnas também foram analisados em cada um dos cães que participaram da pesquisa, tendo sido constatado a baixa infestação de carapatos e pulgas e a inexistência de piolhos e ácaros nos animais avaliados.

Outro ponto importante foi a presença de carapatos no ambiente externo. Tal situação ocorreu em duas propriedades de municípios diferentes, sendo uma das propriedades do município de Barra do Piraí, onde foram encontrados e recolhidos 10 carapatos de *Amblyomma* spp. em diferentes estágios evolutivos, sendo 1 macho e 9 larvas, presentes no ambiente de

quintal, onde os cães da propriedade tinham acesso e na cidade de Piraí também houve uma propriedade em que foram encontrados 6 carapatos machos do gênero *Amblyomma* no jardim da casa em que esses animais residiam.

Na análise bivariada realizada através do teste de Fisher, observou-se nenhuma variável esteve associada à positividade dos animais para *B. vogeli* na população amostral do presente estudo e que somente sob a regressão logística a quantidade de cães em cada propriedade ( $p = 0,01$ ) foi um fator relevante para a positividade de cães para *E. canis*

**Tabela 1.** Análise bivariada de fatores que podem estar relacionados à presença de DNA de *Babesia vogeli* em cães da região do Vale do Paraíba, Rio de Janeiro, Brasil.

FATOR EPIDEMIOLÓGICO	ANÁLISE BIVARIADA			
	VALOR DE P	Razão de Probabilidade	IC 95%	
<b>LOCAL</b>				
SITIOS E CHÁCARAS	0.55	0.72	0.20	- 2.97
FAZENDAS				
<b>PRESENÇA DE MATA</b>				
SIM	0.32	1.89	0.46	- 6.94
NÃO				
<b>QUANTIDADE CÃES</b>				
1	1	0.80	0.08	- 3.95
> 1				
<b>CONTROLE CARRAPATO</b>				
SIM	1	1.02	0.27	- 4.74
NÃO				
<b>GATO</b>				
SIM	0.15	2.72	0.67	- 15.93
NÃO				
<b>BOVINO</b>				
SIM	0.55	1.86	0.45	- 10.88
NÃO				
<b>EQUINO</b>				
SIM	1	1.17	0.32	- 4.73
NÃO				
<b>GAMBÁ</b>				
SIM	0.77	1.29	0.34	- 5.95
NÃO				

<b>ROEDORES</b>				
SIM	0.56	1.43	0.37	- 5.60
NÃO				
<b>ANIMAIS SILVESTRES</b>				
AUSÊNCIA	0.73	1.54	0.32	- 14.94
PRESENÇA				
<b>PARASITICIDA</b>				
SIM	0.47	0.35	0.008	- 2.56
NÃO				
<b>SEXO</b>				
MACHO	1	1.04	0.27	- 3.79
FÊMEA				
<b>RAÇA</b>				
RD	0.29	0.53	0.14	- 2.51
SRD				
<b>IDADE</b>				
< 1 ANO	0.26	0.47	0.12	- 2.25
> 1 ANO				
<b>PELAGEM</b>				
CURTO	0.77	0.77	0.20	- 2.81
MÉDIO E LONGO				
<b>PORTE</b>				
PEQUENO E MÉDIO	1	0.86	0.18	- 3.24
GRANDE				
<b>CASTRADO</b>				
SIM	0.13	0	0.00	- 1.54
NÃO				
<b>PÊLO</b>				
CURTO	0.55	0.60	0.10	- 2.44
MÉDIO E LONGO				
<b>ESCORE</b>				
MAGRO	1	0.93	0.18	- 9.13
NORMAL				
<b>USO VERMIFUGO</b>				
SIM	0.70	0.45	0.01	- 3.30
NÃO				

<b>ECTOPARASITO</b>					
SIM	0.78	1.23	0.33	-	4.64
NÃO					
<b>CARRAPATO</b>					
AUSÊNCIA	0.77	1.32	0.36	-	4.98
PRESença					
<b>PULGAS</b>					
SIM	0.33	1.82	0.44	-	6.72
NÃO					
<b>RHIPICEPHALUS</b>					
PRESença	1	0.83	0.14	-	3.41
AUSÊNCIA					
<b>AMBLYOMMA</b>					
PRESença	0.53	1.53	0.37	-	5.62
AUSÊNCIA					
<b>INFESTAÇÃO FORTE</b>					
SIM	1	0.95	0.02	-	7.35
NÃO					
<b>INFESTAÇÃO BAIXA</b>					
SIM	0.34	1.77	0.43	-	6.52
NÃO					

**Tabela 2.** Análise bivariada de fatores que podem estar relacionados à presença de DNA de *Ehrlichia canis* em cães da região do Vale do Paraíba, Rio de Janeiro, Brasil.

FATOR EPIDEMIOLÓGICO	ANÁLISE BIVARIADA		
	VALOR DE P	Razão de Probabilidade	IC 95%
<b>LOCAL</b>			
SITIOS E CHÁCARAS	0,07	0,42	0,14 - 1,20
FAZENDAS			
<b>PRESença DE MATA</b>			
SIM	0,05	2,64	0,90 - 7,62
NÃO			

**QUANTIDADE CÃES**

<sup>1</sup> > 1	0,01	3,55	1,14 - 10,6
---------------------	------	------	-------------

**CONTROLE CARRAPATO**

SIM NÃO	1	1,06	0,35 - 3,58
------------	---	------	-------------

**GATO**

SIM NÃO	1	0,93	0,33 - 2,7
------------	---	------	------------

**BOVINO**

SIM NÃO	0,14	0,50	0,17 - 1,14
------------	------	------	-------------

**EQUINO**

SIM NÃO	0,23	0,55	0,20 - 1,56
------------	------	------	-------------

**GAMBÁ**

SIM NÃO	0,62	1,35	0,45 - 4,52
------------	------	------	-------------

**ROEDORES**

SIM NÃO	0,62	1,30	0,44 - 3,75
------------	------	------	-------------

**ANIMAIS SILVESTRES**

AUSÊNCIA PRESENÇA	0,25	2,67	0,60 - 24,68
----------------------	------	------	--------------

**PARASITICIDA**

SIM NÃO	0,77	1,13	0,25 - 3,87
------------	------	------	-------------

**SEXO**

MACHO FÊMEA	0,64	1,24	0,43 - 3,52
----------------	------	------	-------------

**RAÇA**

RD SRD	0,77	1,45	0,39 - 8,20
-----------	------	------	-------------

**IDADE**

< 1 ANO > 1 ANO	0,77	0,89	0,25 - 3,89
--------------------	------	------	-------------

<b>PELAGEM</b>				
CURTO	1,00	0,90	0,32	- 2,58
MÉDIO E LONGO				
<b>PORTE</b>				
PEQUENO E MÉDIO	0,80	0,82	0,24	- 2,42
GRANDE				
<b>CASTRADO</b>				
SIM	0,53	0,50	0,05	- 2,30
NÃO				
<b>PÊLO</b>				
CURTO	0,47	1,41	0,47	- 4,03
MÉDIO E LONGO				
<b>ESCORE</b>				
MAGRO	0,50	0,64	0,19	- 2,88
NORMAL				
<b>USO VERMIFUGO</b>				
SIM	1,00	1,00	0,18	- 3,82
NÃO				
<b>ECTOPARASITA</b>				
SIM	0,63	1,31	0,47	- 3,78
NÃO				
<b>CARRAPATO</b>				
AUSÊNCIA	1,00	0,91	0,28	- 2,70
PRESENÇA				
<b>PULGAS</b>				
SIM	0,42	1,59	0,50	- 4,62
NÃO				
<b>RHIPICEPHALUS</b>				
PRESENÇA	0,60	0,30	0,39	- 3,91
AUSÊNCIA				
<b>AMBLYOMMA</b>				
PRESENÇA	0,30	1,69	0,55	- 4,81
AUSÊNCIA				
<b>INFESTAÇÃO FORTE</b>				
SIM	0,20	2,25	0,38	- 9,58
NÃO				

### **INFESTAÇÃO BAIXA**

SIM	0,60	0,65	0,15	-	2,18
NÃO					

Os fatores local, presença de mata, controle de carapato, gato, bovino, equino, outros animais, gambá, roedores, animais silvestres, parasiticida, sexo, raça, idade, pelagem, porte, castrado, pelo, escore, uso de vermífugo, ectoparasito, carapato, pulgas, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, infestação forte, infestação baixa não apresentaram significância para que pudessem ser relacionadas com a infecção por *Ehrlichia canis* na região selecionada para a realização deste trabalho (Tabela 3).

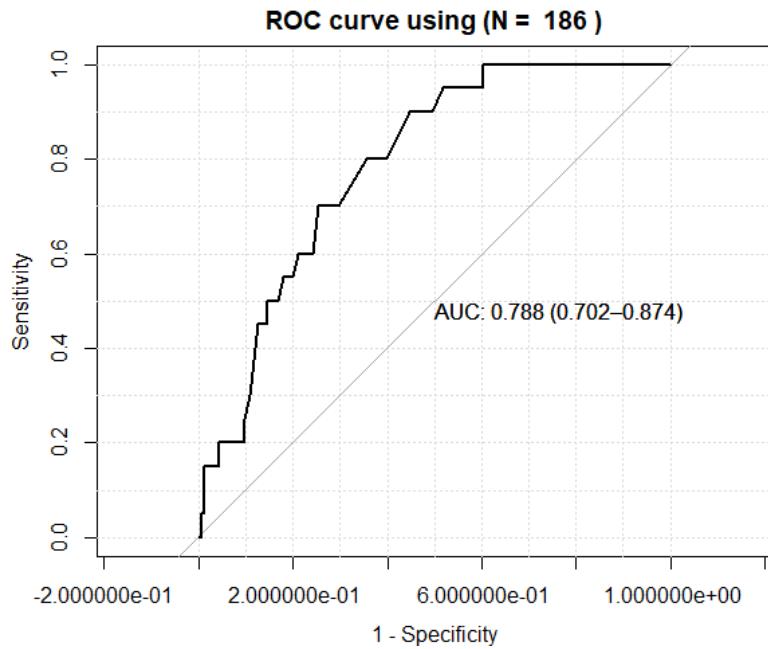
Na análise multivariada, o modelo selecionado continha as variáveis local, vegetação, quantidade de cães na propriedade, presença e ausência de outros animais e animais silvestres, idade, escore e carapato. A quantidade de cães nas propriedades visitadas foi um fator associado com a positividade por *E. canis* em nos municípios que fizeram parte do estudo (Tabela 4).

Desta forma, foi possível observar que cães os quais habitam propriedades onde existem mais de um cão residente tem três vezes mais chances de se infectarem com *E. canis* do que cães de propriedades aonde só existe um cão.

**Tabela 3.** Análise multivariada de fatores associados a presença de DNA de *E. canis* em cães da região do Vale do Paraíba, no estado do Rio de Janeiro.

Variáveis Associadas	Análise Multivariada				
	C ( $\beta$ )	DP	P	OR	IC 95%
Local	-1.01	0.57	0.07	0.36	0.12 - 1.11
Vegetação	0.95	0.54	0.08	2.58	0.89 - 7.47
Número de cães	1.26	0.54	0.02	3.52	1.21 - 10.24
Outros	0.72	0.58	0.21	2.06	0.66 - 6.49
Silvestres	1.13	0.82	0.17	3.08	0.62 - 15.35
Idade	-0.78	0.70	0.27	0.46	0.11 - 1.81
Escore	-0.57	0.68	0.40	0.56	0.15 - 2.13
Carapato	-0.16	0.53	0.76	0.85	0.30 - 2.43

O índice de performance foi de 0.8 (Figura 8), o ajuste do modelo foi 88% ( $p=0.88$ ). O referido modelo é satisfatório pois, a curva ROC encontra-se distante do classificador aleatório (0.5).



**Figura 8:** Gráfico da curva de ROC.

## 5 DISCUSSÃO

A erliquiose monocítica canina e a babesiose são doenças que apresentam distribuição global sendo mais prevalentes em regiões tropicais. Apesar de serem doenças comuns em cães, ambos os parasitos já foram detectados em humanos sendo o caso mais recente de *E. canis* relatado no Panamá (NAVARRETE et al., 2022), tal fato demonstra o potencial zoonótico dessas hemoparasitoses. Sendo assim, a importância de mais pesquisas referentes a esses patógenos e seus vetores bem como sua relação com diferentes ambientes são achados epidemiológicos de relevância para saúde pública.

Neste estudo, desempenhado em área rural, obteve-se uma prevalência de 6,99% de cães positivos para *B. vogeli* e 10,75% positivos para *E. canis* na região do vale do paraíba. De acordo com Dantas-Torres (2018) a prevalência de *E. canis* em cães de área urbana é mais alta quando comparada com cães de zona rural. Tal fato pode estar relacionado com as espécies de vetores os quais esses animais estão expostos, pois, apesar de *R. sanguineus* sensu lato ser o principal transmissor de ambos os patógenos (CABEZAS-CRUZ et al., 2019), este artrópode é mais recorrente em regiões urbanas enquanto que *Amblyomma* spp. é mais frequente em área rural. Situação similar ocorre com *B. vogeli*, parasito presente em diversos estados brasileiros (DANTAS – TORRES et al., 2006), seu principal vetor é o *R. sanguineus* sensu lato sendo que este ectoparasito é mais frequente em áreas urbanas (COSTA et al., 2015). Desta forma, este protozoário tem uma prevalência maior em zona urbana, onde a doença é endêmica (ODWYER et al., 2009). Além disso, a infecção dessa espécie de carrapato por patógenos pode variar de acordo com a região em que são encontrados (DANTAS-TORRES et al., 2008).

Um dos fatores que pode ter influenciado diretamente na baixa frequência desses parasitos foi a baixa infestação dos cães com carrapatos. Um ponto importante observado nas propriedades de zona rural foi que a maioria dos cães ingeriam leite de vaca e algumas destas vacas leiteiras recebiam tratamento com ivermectina, um parasiticida que é capaz de ser transmitido através do leite. A ivermectina é uma substância lipofílica capaz de atravessar a barreira epitelial das glândulas mamárias e, portanto, difundem-se com facilidade no leite (SALMAN et al., 2022). Tal fato pode ter influenciado na infestação de carrapatos nos cães de fazendas leiteiras, pois estes cães ao ingerirem o leite com resíduos de ivermectina podem se tornar protegidos contra o parasitismo dos ectoparasitos e consequentemente de hemoparasitos como *B. vogeli* e *E. canis*.

Outro ponto relevante é o fato do *R. sanguineus* sensu lato apresentar hábito nidícola (LABRUNA; PEREIRA (2001), pois a maioria desses animais de propriedades rurais possuem

o costume de estarem soltos e não apresentarem abrigo fixo, frequentando ambientes de pasto, córregos e matas, fatores que dificultam o parasitismo do *R. sanguineus* sensu lato, uma vez que este artrópode vive em ninho, toca ou abrigo de seus hospedeiros vertebrados.

Outra condição observada e que deve ser pontuada é que em áreas rurais é comum que cães convivam próximo a diferentes espécies de animais, como equinos e bovinos e que auxiliem a pastorear o gado, tal característica permite que a interação desses animais propicie o compartilhamento de ectoparasitas. O artrópode hematófago *R. microplus* está distribuído globalmente em regiões tropicais e subtropicais, e são popularmente conhecidos pelo hábito de parasitar bovinos (PEREIRA et al., 2022). Estes ixodídeos foram detectados parasitando cães que tinham acesso ao pasto ou que desempenhavam a função de pastorear o gado da propriedade. Uma pesquisa realizada em área rural, no estado de Minas Gerais, aponta que apesar do *R. microplus* não ser a principal espécie de carapato que infesta cães em zona rural, este ectoparasito aparece esporadicamente parasitando cães (COSTA-JUNIOR et al., 2012). Tal fato apresenta relevância devido a capacidade do *R. microplus* ser reservatório e transmissor de *B. vogeli*, protozoário que normalmente é associado ao *R. sanguineus* (COTES-PERDOMO et al., 2020). No entanto, neste trabalho foram encontrados poucos cães parasitados por *R. microplus*, mais uma razão que pode ter influenciado na baixa frequência desse parasito nos cães avaliados.

O número de cães na propriedade foi uma característica com significância estatística quanto a presença dos parasitos *E. canis* quando havia mais de um cão nas propriedades. Desse modo, basta que um dos cães da propriedade rural tenha acesso a mata e contato com animais silvestres ou outros cães para que este cão seja capaz de se infestar com diferentes vetores, e consequentemente ser uma fonte de infecção para os demais cães que residem na mesma propriedade.

Sendo assim, propriedades que apresentavam mais de um cão tinham três vezes mais chance de se infectarem quando comparado a propriedades onde reside apenas um cão. Outros fatores examinados na análise bivariada não apresentaram significância como foi o caso da presença ou ausência de gato ( $p=1$ ), porém há estudos que demonstram que mesmo sendo menos frequente, gatos domésticos se infectam naturalmente com *B. vogeli* e *E. canis* (VILHENA et al., 2017; MAGGI; KRÄMER, 2019). Outro animal que não foi um fator significativo para DNA de *B. vogeli* e *E. canis* foi o bovino ( $p=0,14$ ), no entanto o carapato *R. microplus*, comum em bovinos, é um dos ixodídeos capazes de transmitir *B. vogeli* (COTES-PERDOMO et al., 2020). Os fatores ausência e presença de ectoparasitas ( $p=0,63$ ) e carrapatos ( $p=1$ ) também não foram significativos para a infecção de cães com os hemoparasitos

estudados neste trabalho, contrariando diversos estudos realizados com carrapatos que comprovam que a presença do vetor da doença é um dos principais fatores para infecção de cães com os patógenos *B. vogeli* e *E. canis* (MAGGI; KRÄMER, 2019). Além disso a variável idade ( $p=0,77$ ) que de acordo com (IRWIN, 2010) costuma ter influência em relação a infecção com esses hemoparasitos também não foi significativa. O parasito *B. vogeli* ocorre em cães de todas as idades sendo mais recorrentes em cães jovens (ALMAZÁN et al., 2022), enquanto *E. canis* é mais frequente em cães mais velhos.

Em relação à utilização de um método diagnóstico preciso e eficaz para detecção de *B. vogeli* e *E. canis*, optou-se pela qPCR por ser uma ferramenta de alta especificidade e sensibilidade, quando comparada com outras técnicas comumente utilizadas para o diagnóstico desses patógenos. No entanto, também foi adotado o método de nPCR com o intuito de descobrir outras espécies de *Babesia*, porém as amostras positivas na nPCR foram enviadas para sequenciamento na Fiocruz e todas as amostras positivas obtiveram 99.9% de semelhança com a espécie *B. vogeli*.

Entre as várias técnicas existentes de PCR foi escolhida a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) para a realizar a detecção de *B. vogeli* e *E. canis* neste trabalho. A técnica de qPCR é um método semiquantitativo, de alta sensibilidade e permite obter resultados em um período curto de tempo. Ela permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção de uma só vez (REGITANO et al., 2007). Enquanto o teste de McNemar mede as proporções de discordância entre as duas técnicas de PCR escolhidas.

Referente a escolha dos genes para *B. vogeli* e *E. canis* analisados nesse estudo, foi baseado no gene *hsp70* para espécie *B. vogeli* (PAULINO et al., 2018) e no gene 16S rRNA para espécie de *E. canis* (BANETH et al., 2009), ambos os autores sugerem a técnica de qPCR para seus respectivos genes. Os genes alvos escolhidos são amplamente utilizados para os diagnósticos por meio de biologia molecular, devido à sua capacidade de se manter altamente conservado.

## **6 CONCLUSÃO**

Este estudo relatou que o número de cães nas propriedades foi o único fator epidemiológico significativo associado as infecções de *E. canis* em cães nos sete municípios selecionados para a realização do trabalho, sendo assim na região do vale do paraíba as propriedades rurais que contém mais de um cão apresentam três vezes mais chances de terem esses animais infectados com um ou ambos os hemoparasitos analisados. A baixa infestação de carapatos nesses animais de zona rural ainda necessita de mais pesquisas para melhor compreensão da relação que há entre meio ambiente, hospedeiro vertebrado, hospedeiro invertebrado e hemoparasitos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M. et al. Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 2, p. 135-141, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13390>
- ALMAZÁN, C. et al. Babesiosis and Theileriosis in North America. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 168, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11020168>
- ALVARADO-RYBAK, M. et al. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>
- ARROYAVE, E. et al. *Ehrlichia canis* TRP36 diversity in naturally infected dogs from an urban area of Colombia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 3, p. 101367, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101367>
- AZIZ, M. U. et al. Ehrlichiosis in Dogs: a comprehensive review about the pathogen and its vectors with emphasis on south and east asian countries. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1, p. 21, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci10010021>
- BANETH, G. et al. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 321-325, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.022>
- BANETH, G. et al. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0830-5>
- BECK, R. et al. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 7, p. 843-848, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.12.005>
- BERRADA, Z. L.; TELFORD, S. R. Burden of Tick-borne Infections on American Companion Animals. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 175-181, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2009.06.005>
- BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0195-5616\(03\)00039-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0195-5616(03)00039-1)
- BORRÁS, P. et al. Use of molecular tools for the diagnosis of rangeliosis by *Rangelia vitalii* in Argentina: a case report. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 1004-1026, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.10.0426>
- BOZDOGAN, H. Model selection and Akaike's information criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. **Psychometrika**, v. 52, 345-370, 1987.

CABEZAS-CRUZ, A. et al. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.). **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-3194-9>

CASSINI, R. et al. Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 30-35, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.044>

CATALDO, S. et al. *Babesia vogeli* in dogs in Chile. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 6, p. 2296-2299, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13609>

COSTA, A. P. et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 28-35, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612015008>

COSTA-JUNIOR, L. M. et al. Occurrence of ectoparasites on dogs in rural regions of the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 237-242, 2012.

COTES-PERDOMO, A. P. et al. Molecular detection of pathogens in ticks associated with domestic animals from the Colombian Caribbean region. **Experimental and Applied Acarology**, v. 82, n. 1, p. 137-150, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-020-00531-0>

CHAUVIN, A. et al. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 37, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2009020>

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: a brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

DANTAS-TORRES, Filipe et al. *Ehrlichia* spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-6, 20 mar. 2018. Mestral. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2738-3>.

DIXIT, P.; DIXIT, A. K.; VARSHNEY, J. P. Evidence of new pathogenic Theileria species in dogs. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 29-32, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-010-0009-0>

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective

synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Internation Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

EBANI, V. V. et al. Serological survey of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia canis* infections in rural and urban dogs in Central Italy. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 21, n. 4, p. 671-675, 2014. Institute of Rural Health. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5604/12321966.1129912>.

EIRAS, D. F. et al. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangeliosis) in Argentina. **Parasitology International**, v. 63, n. 5, p. 729-734, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.06.003>

FINIZIO, A. L. et al. Soluble parasite antigens from *Babesia canis* do not directly activate the kallikrein system in dogs infected with *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 132-138, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.005>

FRANÇA, R. T. et al. Canine rangeliosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day: a review. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 466-474, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.005>

GARCÍA-QUESADA, A. et al. Seroprevalence and prevalence of *Babesia vogeli* in clinically healthy dogs and their ticks in Costa Rica. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-021-04936-7>

GHAURI, H. N. et al. A comprehensive review on past, present, and future aspects of canine theileriosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 116-122, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.033>

INÁCIO, E. L. et al. Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 321-327, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.009>.

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

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA et al. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 553-556, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352001000500007>

LEMOS, T. D. et al. Detecção e caracterização molecular de piroplasmas em cães naturalmente infectados no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 137-142, 2012.

LEMOS, T. D. et al. Clinical and hematological evaluation of *Rangelia vitalii* naturally infected dogs in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 307-313, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/jrnqn9Q8H8ckZMs7hL>

LOBATO, V. et al. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 7, p. 668-673, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030600627206>

LORENZO, C. et al. *Rangelia vitalii* in free-living crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Uruguay. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1017-1065, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101765>

MAGGI, R. G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-37, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>

MATJILA, P. T. et al. Detection of a *Theileria* species in dogs in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 34-40, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.025>

MEDRONHO, R. Epidemiologia. 2<sup>a</sup> ed. Atheneu, São Paulo, 676p. 2009.

MEINKOTH, J. H.; KOCAN, A. Feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 1, p. 89-101, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.08.003>

MELO, A. L. T. et al. 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, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12139>

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 2-8, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.021>

O'DWYER, L. H. et al. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parassitologia Veterinária**, v. 18, n. 02, p. 23-26, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01802005>

OJEDA-CHI, M. M. et al. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: prevalence, incidence, coinfection, and factors associated. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 67, p. 101351, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>

OLIVEIRA, C. M. et al. Canine piroplasmids: molecular detection and laboratory characterization in dogs from Brasília, Brazil, with the first molecular evidence of dog exposure to a novel opossum-associated *Babesia* sp. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 14, n. 4, p. 1021-1081, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102181>

OLIVEIRA, P. B. et al. Serologic and molecular survey of *Rickettsia* spp. in dogs, horses, and ticks from the Atlantic rainforest of the state of Bahia, Brazil. **Experimental and Applied**

**Acarology**, v. 78, n. 3, p. 431-442, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-019-00397-x>

**PREFEITURA DE BARRA DO PIRAIÍ. Portal da Prefeitura de Barra do Piraí:** governo para todos. Governo para todos. 2015. Disponível em: <https://www.barradopirai.rj.gov.br/portal/>. Acesso em: 10 abr. 2015.

PAULA, L. G. F. et al. Seasonal dynamics of *Amblyomma sculptum*: a review. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05311-w>

PAULINO, P. G. et al. Comparison of heat shock protein 70 kDa and 18S rDNA genes for molecular detection and phylogenetic analysis of *Babesia vogeli* from whole blood of naturally infected dogs. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 556-562, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.013>

PASSOS, L. M. F. et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.028>

PEREIRA, D. F. S. et al. *Rhipicephalus microplus*: an overview of vaccine antigens against the cattle tick. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 13, n. 1, p. 101828, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101828>

QUROLLO, B. et al. Feline Vector-Borne Diseases in North America. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p. 687-702, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.012>

RAHAMIM, M. et al. *Ehrlichia canis* morulae in peripheral blood lymphocytes of two naturally-infected puppies in Israel. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, p. 100554, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprs.2021.100554>

REICHARD, M. V. et al. Cytauxzoonosis in North America. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1170, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10091170>

REGITANO, A. C. L. et al. Protocolos de Biologia Molecular aplicados à Produção Animal. **EMBRAPA**, 2007.

ROSA, C. T. et al. Theileriosis in six dogs in South Africa and its potential clinical significance. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 85, n. 1, p. 1-7, 20, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25685903/>

SANTOS, F. B. et al. Microscopic detection, hematological evaluation and molecular characterization of Piroplasms from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 4, p. 1548-1560, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11686-021-00426-z>

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. 1-6, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/270345>

SALIM, B. et al. Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. **Acta Tropica**, v. 193, p. 78-83, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.029>

SALMAN, M. et al. Assessment of Avermectins-Induced Toxicity in Animals. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 332, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15030332>

SELIM, A. et al. Molecular survey and phylogenetic analysis of *Babesia vogeli* in dogs. **Nature: Scientific Reports**, v. 12, n. 6988, p. 1-7, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-11079-x>

SILVA, B. R. et al. Detection molecular of *Rangelia vitalii* in dogs from Paraná State, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 310-313, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30540115/>

SOARES, J. F. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 34, p. 203-208, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>

SOARES, J. F. et al. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 12, p. 98-101, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.013>.

SOARES, J. F. et al. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliosis. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1221-1234, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.004>.

SOUZA, V. K. et al. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the pampa biome, Brazil. **Parasitology Research**, v. 118, n. 4, p. 1337-1342, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-019-06245-6>  
SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>

SYKES, J. E. Ehrlichiosis. In: **Canine and Feline Infectious Diseases**, c. 28, p. 278-289, Elsevier Saunders, 2014.

TABOADA, J. et al. Seroprevalence of babesiosis in Greyhounds in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 1, p. 47-50, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

TRAPP, S. M.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Babesiose Canina. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 2, n. 7, p. 211-217, 2004. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-368>

UILLENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 12, p. 3-10, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

VANNIER, E. G. et al. Babesiosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 357-370, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.008>

PREFEITURA MUNICIPAL DE VASSOURAS. **Governo e Planejamento**. 2018. Disponível em: <https://www.vassouras.rj.gov.br/>. Acesso em: 12 ago. 2018.

VIEIRA, R. F. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2010.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Avaliação sorológica de patógenos transmitidos por carrapatos em cães urbanos e rurais do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612013000100019>

VILHENA, H. et al. Acute phase proteins response in cats naturally infected with *Hepatozoon felis* and *Babesia vogeli*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 72-76, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12451>

WANG, J. L. et al. Two Tales of *Cytauxzoon felis* Infections in Domestic Cats. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 861-885, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00010-17>

WIKANDER, Y. M. et al. Acute *Cytauxzoon felis* cases in domestic cats from Eastern Kansas, a Retrospective Case-Control Study (2006–2019). **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 205, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci7040205>

## **ANEXOS**

**ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**ANEXO B - Questionário epidemiológico semiestruturado aplicado aos proprietários de cães domiciliados nos municípios selecionados para a realização do presente estudo: Seropédica, Paracambi, Piraí, Barra do Piraí, Barra Mansa, Pinheiral e Vassouras, todos situados no estado do Rio de Janeiro**

**ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) autorizando a realização do trabalho de pesquisa, cumprindo às diretrizes éticas de uso animal**

## **ANEXO A**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do participante:

Data de nascimento:

Você está sendo convidado (a) para ser participante do projeto do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em bovinos e cães.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Caso se sinta esclarecido (a) sobre as informações que estão neste Termo e aceite fazer parte do estudo, peço que assine ao final deste documento, em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável pela pesquisa. Saiba que você tem total direito de não querer participar.

1. O trabalho visa estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em bovinos e cães de propriedades rurais.

- propriedades rurais.

  2. A participação nesta pesquisa consistirá em oferecimento de campo para coleta de amostras de bovinos e cães para as pesquisas da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ.
  3. Os participantes não terão nenhuma despesa ao participar da pesquisa e poderão retirar sua concordância na continuidade da pesquisa a qualquer momento.
  4. Não há nenhum valor econômico a receber ou a pagar aos voluntários pela participação, no entanto, caso haja qualquer despesa recorrente desta participação haverá o ressarcimento pelos pesquisadores.
  5. O nome dos participantes será mantido em sigilo, assegurando assim a sua privacidade, e se desejarem terão livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que queiram saber antes, durante e depois de sua participação.
  6. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para fins desta pesquisa e os resultados poderão ser publicados.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ declaro ter sido informado e concordo em ser participante do Projeto de pesquisa acima descrito.

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

### Assinatura do participante

Assinatura do responsável por obter o consentimento

**ANEXO B**  
**Questionário epidemiológico – Propriedade e tutor**

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Propriedade Nº \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana  
Bairro e Município: \_\_\_\_\_ Altitude: \_\_\_\_\_ Temperatura: \_\_\_\_\_  
Coord. Geográf.: \_\_\_\_\_  
Proprietário: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Tel: \_\_\_\_\_  
E-mail: \_\_\_\_\_

- 1) Tipo de residência: ( ) pau a pique ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) outros: \_\_\_\_\_
  - 2) Há parasitismo por carrapatos em pessoas: ( ) sim ( ) não ( ) já ocorreu
  - 3) Tipo de vegetação predominante: \_\_\_\_\_
  - 4) Quantos cães possui em casa?
  - 5) Prática alguma ação para controle de carrapato? sim ( ) não ( ) Qual? \_\_\_\_\_
  - 6) Leva o cão ao veterinário? sim ( ) não ( ) Qual a
  - 7) Periodicidade?
  - 8) Presença de outras espécies domésticas: ( ) gatos ( ) bovinos ( ) equinos ( ) outros: \_\_\_\_\_
  - 9) Presença de animais silvestres: ( ) gambá ( ) roedores( ) outros:
  - 10) Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? \_\_\_\_\_
  - 11) Utiliza prod. inseticidas no ambiente? ( ) sim ( ) não
  - 12) Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos? \_\_\_\_\_
  - 13) Utiliza mét. Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)? ( ) sim ( ) não
  - 14) Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos? \_\_\_\_\_
- Outras obs relevantes:

## Questionário epidemiológico – Animal

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Propriedade Nº \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana

Localidade: \_\_\_\_\_ Proprietário: \_\_\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea

Raça: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Porte: \_\_\_\_\_

1) Animal Castrado? ( ) Sim ( ) Não

2) Animal nascido na propriedade? ( ) sim ( ) não Se não, de onde veio o animal?  
\_\_\_\_\_

3) Há quanto tempo está com o animal? \_\_\_\_\_

4) Histórico de carapatos antes: ( ) sim ( ) não

5) Histórico de carapatos na vizinhança: ( ) sim ( ) não

6) Pêlo: ( ) curto ( ) médio ( ) longo

7) Escore: ( ) caquético ( ) magro ( ) normal ( ) obeso

8) Comportamento: ( ) triste ( ) ativo/normal ( ) agitado

9) Animal vive dentro da residência: ( ) sim ( ) não ( ) às vezes

10) Locais de acesso do animal: ( ) pastagens ( ) córregos ( ) matas ( ) ambiente urbano

11) Contato direto com outras sp animais: ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

Histórico de patologias anteriores: \_\_\_\_\_

12) Fez uso de algum medicamento recente? Qual?

13) Tipo de alimentação: ( ) comida ( ) ração ( ) ambos

14) Possui água e comida à disposição o tempo todo? ( ) sim ( ) não

Se não come quantas vezes ao dia: \_\_\_\_\_

15) Vermifugação: ( ) sim ( ) não Há qto tempo? \_\_\_\_\_

16) Qual produto? \_\_\_\_\_

17) Critério para escolha: ( ) indicação ( ) balconista ( ) veterinário ( ) propaganda

18) Possui ectoparasitos? ( ) sim ( ) não

19) Quais e quantidade? (+)

( ) pulgas \_\_\_\_\_

( ) piolhos \_\_\_\_\_

sarnas \_\_\_\_\_

carrapatos \_\_\_\_\_ Fases: \_\_\_\_\_ espécies: \_\_\_\_\_

Condição de limpeza do ambiente do animal:

Ruim  Satisfatória  Insatisfatória

## Anexo C

Parecer do Comitê de Ética do Uso de Animal (CEUA) autorizando a realização do trabalho de pesquisa, cumprindo as diretrizes éticas de uso animal.



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**  
Instituto de Veterinária



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Novas metodologias moleculares para detecção dos hemoparasitos *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia vogeli* em cães e carrapatos.", protocolada sob o CEUA nº 3915240616 no sistema, sob a responsabilidade de **Huarrisson Azevedo Santos** e equipe; **Patrícia Gonzaga Paulino** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 26/04/2017.

We certify that the proposal "New molecular methods for the detection of blood parasites *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia vogeli* in dogs and ticks.", utilizing 100 Dogs (males and females), protocol number CEUA 3915240616 system, under the responsibility of **Huarrisson Azevedo Santos** and team; **Patrícia Gonzaga Paulino** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 04/26/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 06/2017 a 06/2018

Área: Microbiologia E Imunologia Veterinária

Origem: Não aplicável biotério

Sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 15 anos

N: 100

Espécie: Cães

Peso: 1 a 60 kg

Linhagem: Diversas raças

Local do experimento: Os testes moleculares desenvolvidos neste projeto serão executados no Laboratório de Sanidade Avícola e Multuso do DESP e também no Laboratório de Hemoparasitos e Vectores. Estes laboratórios possuem infraestrutura adequada para realização de todas as etapas metodológicas previstas. As amostras de sangue de cães serão coletadas no domicílio do cão no estado do Rio de Janeiro, após consentimento dos proprietários.

Seropédica, 02 de janeiro de 2020

*Fábio B. Scott*

Prof. Dr. Fábio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

*Carlos Alexandre Rey Matias*

Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro