DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITOS E CARRAPATOS DE CÃES PROCEDENTES DE ÁREAS RURAIS EM TRÊS MESORREGIÕES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA

T
595.122744 12
O14d

2000

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-
Parasitologia Veterinária

DIAGNÓSTICO DE HEMOPARSITOS E CARRAPATOS DE CÃES PROCEDENTES DE ÁREAS RURAIS EM TRÊS MESORREGIÕES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:
DR. CARLOS LUIZ MASSARD

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de *Phylosophae Doctor* em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária

SEROPÉDICA
RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2000

DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITOS E CARRAPATOS DE CÃES PROCEDENTES DE ÁREAS RURAIS EM TRÊS MESOREGIÕES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

LÚCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA

Aprovado em 23/03/2000

CARLOS LUIZ MASSARD _____

NADIA REGINA PEREIRA ALMOSNY _____

NORMA LABARTHE _____

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA _____

CLAUDIO ROBERTO MADRUGA _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Dilton e Hermínia.
Aos meus irmãos,
Antônio Maurício e
Gisele.
Aos meus sobrinhos,
Gustavo e Brena.

Que esta tese
possa representar
um pouco
do amor que eu sinto
por vocês.

AGRADECIMENTOS

É gratificante, ao final de uma tese, nos lembrarmos de tantas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com o nosso trabalho. A todas essas pessoas, a minha mais profunda gratidão.

Ao professor, Dr. CARLOS LUIZ MASSARD, pela confiança, amizade, orientação e, principalmente, pelas horas agradáveis que passamos durante o trabalho de campo, e que muito me ensinaram sobre o povo do meu país.

Ao colega, JOSÉ CARLOS PEREIRA DE SOUZA, pelo companheirismo de todas as horas, e, também, pela ajuda inestimável nos trabalhos de campo.

Ao colega, CLEBER OLIVEIRA SOARES, pela realização do teste de ELISA, para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi.*

À professora, Dra. NÁDIA ALMOSNY, pelos conselhos, presença constante e ombro amigo.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, em especial, ao Sr. ARCHANJO GONÇALVES e ao Sr. OSWALDO SILVA, pelo cuidado com os cães.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia Animal, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

É gratificante, ao final de uma tese, nos lembrarmos de tantas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com o nosso trabalho. A todas essas pessoas, a minha mais profunda gratidão.

Ao professor, Dr. CARLOS LUIZ MASSARD, pela confiança, amizade, orientação e, principalmente, pelas horas agradáveis que passamos durante o trabalho de campo, e que muito me ensinaram sobre o povo do meu país.

Ao colega, JOSÉ CARLOS PEREIRA DE SOUZA, pelo companheirismo de todas as horas, e, também, pela ajuda inestimável nos trabalhos de campo.

Ao colega, CLEBER OLIVEIRA SOARES, pela realização do teste de ELISA, para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi.*

À professora, Dra. NÁDIA ALMOSNY, pelos conselhos, presença constante e ombro amigo.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz, em especial, ao Sr. ARCHANJO GONÇALVES e ao Sr. OSWALDO SILVA, pelo cuidado com os cães.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia Animal, pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia animal, pelo carinho e dedicação.

Aos colegas de curso, que tornaram minhas atividades, na UFRRJ, mais agradáveis, deixando muita saudade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia, UNESP-Botucatu, pelo carinho com que me receberam.

Ao professor, Dr. ALESSANDRO F. TALAMINI DO AMARANTE, pelas valiosas sugestões.

À professora, Dra. ELIZAIDE L. DE ALVARENGA YOSHIDA, pela ajuda na realização do teste de imunofluorescência indireta, para detecção de anticorpos anti-*Babesia canis*.

À professora, LUCIENE MAURA MASCARINI, pela amizade.

Ao funcionário, WALDIR ÂNGELO PANIGUEL, que tratou dos cães com tanto carinho.

À professora, Dra. AGUEMI KONAYAGAWA, pela amostra de *Babesia canis*.

Ao professor, Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI, pela análise estatística da tese.

Aos cães, utilizados na pesquisa, pela docilidade e enorme paciência.

À CARGILL S/A, pelo fornecimento de ração balanceada aos cães que foram mantidos na UFRRJ.

A todos que me ajudaram, nestes quatro anos de trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA, filha de Dilton Barreto de Oliveira e Hermínia O'Dwyer de Oliveira, nasceu a 28 de Setembro de 1965, na cidade de São Paulo.

Em 1971, transferiu-se, com a sua família, para o Rio de Janeiro, onde concluiu o 1° e o 2° grau, no Colégio Santo Inácio.

No ano de 1983, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 1987.

Durante três anos, trabalhou no Instituto Vital Brazil, em Niterói, Rio de Janeiro; e, em 1991, ingressou, através de concurso público para Médico Veterinário, no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, que deixou em 1998.

Em 1994, foi selecionada e ingressou no curso de Pós-graduação, em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, em nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tendo defendido e apresentada, em fevereiro de 1996, a dissertação intitulada: **Aspectos Biológicos e do Desenvolvimento da *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895), pelo *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), no Brasil.**

Em 1996, ingressou no Doutorado da mesma instituição.

Também, em 1996, foi aprovada, em concurso público, para professor assistente do Departamento de Doenças Parasitárias da USP.

De 1997 a 1998, foi professora substituta da Disciplina de Parasitologia Veterinária, na UFRRJ, após concurso público seletivo do DPA/IB/UFRRJ.

No ano de 1998, foi aprovada, em primeiro lugar, e ingressou como professora assistente do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO..... pag 1

2. REVISÃO DE LITERATURA..... pág. 3

2.1-*Babesia canis* (Piana & Galli-valerio, 1895)..... pág. 3

2.2-*Hepatozoon canis* (James, 1905)..... pág. 9

2.3- *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935)..... pág. 16

2.4- *Borrelia burgdorferi* Johnson *et alii*, 1984 *lato sensu*..... pág. 20

2.5- Carrapatos..... pág. 23

3. MATERIAL E MÉTODOS..... pág 26

3.1- Local do Experimento..... pág. 26

3.2- Coleta e processamento do Material..... pág 27

3.3- Realização do teste de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis*... pág. 28

3.3.1- Cães utilizados no preparo do antígeno..... pág. 28

3.3.2- Preparo do Antígeno..... pág. 29

3.3.3- Reação de Imunofluorescência Indireta..... pág. 29

3.4- Ensaio Imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*..... pág. 30

3.5- Coleta e Identificação de carrapatos..... pág. 31

3.6- Análise Estatística..... pág. 32

4- RESULTADOS..... pág. 33
4.1- Coleta e processamento do material..... pág. 33
4.2- Hemoparasitos..... pág. 39
4.3- *Babesia canis*..... pág. 39
4.3.1- Diagnóstico parasitológico..... pág. 39
4.3.2- Diagnóstico sorológico de anticorpos anti- *Babesia canis* pela reação de Imunofluorescência indireta (IFI)..... pág. 46
4.4- *Hepatozoon canis*..... pág. 51
4.5- *Ehrlichia canis*..... pág. 56
4.6- Diagnóstico sorológico de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi lato sensu pelo* método de ELISA indireto..... pág. 61
4.7- Carrapatos..... pág. 66
5. DISCUSSÃO..... pág. 76
5.1- Coleta e processamento do material..... pág. 76
5.2- Hemoparasitos..... pág. 77
5.3- *Babesia canis*..... pág. 77
5.3.1- Diagnóstico parasitológico..... pág. 77
5.3.2- Diagnóstico sorológico de anticorpos anti- *Babesia canis* pela reação de Imunofluorescênca Indireta (IFI)..... pág. 78
5.4- *Hepatozoon canis*..... pág. 81
5.5- *Ehrlichia canis*..... pág. 83
5.6- Diagnóstico sorológico de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi lato sensu* pelo método de ELISA indireto..... pág. 85
5.7- Carrapatos..... pág. 87
6- CONCLUSÕES..... pág. 90
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... pág. 91

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Distribuição das faixas etárias de cães examinados em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 37

Tabela 2-Distribuibuição das faixas etárias de cães examinados em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 38

Tabela 3- Número de animais positivos para *Hepatozoon canis, Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, diagnosticados pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães de áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 40

Tabela 4- Número de animais positivos para *Hepatozoon canis, Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, diagnosticados pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães de áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 41

Tabela 5- Ocorrência de *Babesia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sanguíneo, em cães examinados em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 43

Tabela 6- Ocorrência de *Babesia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sanguíneo, em cães examinados em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 44

Tabela 7- Ocorrência de *Babesia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sangüíneo, segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 45

Tabela 8- Ocorrência de anticorpos anti- *Babesia canis*, diagnosticados, pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), em soros de cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 48

Tabela 9- Ocorrência de anticorpos anti- *Babesia canis*, diagnosticados, pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), em soros de cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 49

Tabela 10- Ocorrência de anticorpos anti-*Babesia canis*, diagnosticada pelo método de Imunofluorescência indireta (IFI), segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 50

Tabela 11- Ocorrência de *Hepatozoon canis*, diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 53

Tabela 12- Ocorrência de *Hepatozoon canis*, diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 54

Tabela 13- Ocorrência de *Hepatozoon canis*, diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 55

Tabela 14- Ocorrência de *Ehrlichia canis*, diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 58

Tabela 15- Ocorrência de *Ehrlichia canis*, diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 59

Tabela 16- Ocorrência de *Ehrlichia canis*, diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em relação à faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 60

Tabela 17- Ocorrência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi lato sensu*, diagnosticados pelo método de ELISA indireto, em soros de cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 63

Tabela 18- Ocorrência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi lato sensu*, diagnosticados pelo método de ELISA indireto, em soros de cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 64

Tabela 19- Distribuição de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu*, diagnosticada pelo método de ELISA indireto, segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 65

Tabela 20- Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães examinados em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 69

Tabela 21- Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães examinados em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 70

Tabela 22- Ocorrência de *Amblyomma cajennense* coletados em cães examinados em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 71

Tabela 23- Ocorrência de *Amblyomma cajennense* coletados em cães examinados em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 73

Tabela 24- Relação entre a ocorrência de *Hepatozoon canis*, diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, e a presença de *Amblyomma cajennense* coletados em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 74

Tabela 25- Relação entre a ocorrência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi lato sensu*, diagnosticado pelo método de ELISA indireto, e a presença de *Amblyomma cajennense* coletados em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Algumas características de residências visitadas para exame de cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 34

Figura 2- Propriedade, próxima à mata secundária, visitada durante a coleta de material e exame de cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 35

Figura 3A e 3B- *Babesia canis* diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em eritrócitos de cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro ..... pág. 42

Figura 4- Reação de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis* em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro:
Fig.A- Reação positiva/ Fig.B- Reação negativa..... pág. 47

Figura 5- Gametócitos de *Hepatozoon canis*, diagnosticados, pelo método de esfregaço sangüíneo, observados em polimorfonucleares de cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro:
Fig.A- vista lateral /Fig. B- vista dorsal ..... pág. 52

Figura 6- Mórula de *Ehrlichia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sangüíneo, em mononuclear de cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 57

Figura 7- Pesquisa de anticorpos da classe IgG anti- *Borrelia burgdorferi lato sensu*, pelo método de ELISA indireto, em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro..... pág. 62

Figura 8- Carrapatos encontrados em cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro:
Fig. 8A- *Rhipicephalus sanguineus*, fêmea e macho
Fig. 8B-A*mblyomma. cajennense*, fêmea e macho ..... pág. 67

Figura 9- Carrapatos encontrados em cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro:
Fig. 9A- *Amblyomma ovale* / Fig. 9B- *Amblyomma aureolatum* ..... pág. 68

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar quais espécies de hemoparasitos e de carrapatos ocorrem em cães de áreas rurais do Rio de Janeiro. Além disto, verificou-se a ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu,* no soro desses animais. Foram examinados 250 cães de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro, em três mesorregiões, sempre em áreas com características rurais e com matas nas proximidades. Foram 26 cães, em Seropédica; 82, em Itaguaí; 41, em Paracambi; e 26, em Mangaratiba (Mesorregião Metropolitana); 32, em Barra do Piraí; e 32, em Piraí (Mesorregião do Médio Paraíba); e 11, em Miguel Pereira (Mesorregião Centro-Sul Fluminense). Foram realizados esfregaços sangüíneos e coleta de sangue, para realização de diagnóstico sorológico de anticorpos anti-*Babesia canis*, pelo método de imunofluorescência indireta (IFI), e de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu*, pelo método de ELISA. Também foram coletados carrapatos, que foram posteriormente identificados em laboratório. Do total de animais examinados, pelo método de esfregaço sangüíneo, 45,2% apresentavam-se positivos para hemoparasitos, sendo que a positividade variou de 11,5%, em Mangaratiba a 71,8%, em Piraí. *Babesia canis* foi observada em 5,2% dos cães, *Hepatozoon canis* em 39,2% e *Ehrlichia canis* em 4,8%. Foram encontradas associações entre *H. canis* e *B. canis*

e entre *H. canis* e *E. canis*. O teste de IFI foi feito com amostras de 205 animais. Destas, 41,1% mostraram -se positivas para anticorpos anti-*B. canis*, com títulos superiores a 1:40. Nesse caso, a região com maior prevalência foi a de Mangaratiba (63,6%), e a de menor, Miguel Pereira (20%). Foram encontradas quatro espécies de carrapatos parasitando os animais: *Amblyomma cajennense* (23,6%), *Rhipicephalus sanguineus* (12,4%), *Amblyomma aureolatum* (2,8%) e *Amblyomma ovale* (2,0%). A primeira espécie foi observada principalmente nos seus estágios jovens, larvas e ninfas, enquanto só foram recuperados adultos das outras três. Houve correlação positiva entre a presença de *A. cajennense* e *H. canis*. Foram utilizados soros de 199 cães na pesquisa de anticorpos anti-*B. burgdorferi*. Destes, 15,58% foram positivos, com títulos que variaram de 1:400 a 1:1600. As maiores prevalências foram observadas, em Miguel Pereira (30,0%), Piraí (21,4%) e Itaguaí (21,1%). Esses valores estão próximos aos encontrados em áreas endêmicas e indicam a presença dessa bactéria em cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the species of hemoparasites that infect dogs of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. The ocurrence of antibodies anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu* was also investigated. Two hundred and fifty dogs from seven municipalities of Rio de Janeiro State, were examined on rural areas always nearby forests. From this total, 26 dogs were from Seropédica, 82 from Itaguaí, 41 from Paracambi, 11 from Miguel Pereira and 26 from Mangaratiba. Blood smears were done and blood samples were collected in order to perform serologic diagnosis of antibodies anti-*Babesia canis* by indirect fluorescent test and of antibodies anti-*Borrelia burgdorferi latu sensu* by ELISA test. Ticks were collected and identified. From the animals examined by blood smear evaluation, 45,2% were positive for hemoparasites. The positivity ranged from 11,5% in Mangaratiba to 71,8% in Piraí. *Babesia canis* was diagnosticated in 5,2% of the dogs; *Hepatozoon canis* in 39,2% and *Ehrlichia canis* in 4,8%. Association between *H. canis* and *B. canis* and between *H. canis* and *E. canis* were noted. The indirect fluorescent test was done with 205 samples, from which 41,1% was positive for *B. canis* with titers higher than 1:40. In this evaluation, the area with the highest prevalence was Mangaratiba (63,6%) and

the one with the lowest was Miguel Pereira (20%). Four tick species were found parasitizing dogs: *Amblyomma cajennense* (23,6%), *Rhipicephalus sanguineus* (12,4%), *Amblyomma aureolatum* (2,8%) and *Amblyomma ovale* (2,0%). The first specie was found mainly in larval and ninfal stage, while in the other three species the individuals were adults. There was positive correlation between the presence of *A. cajennense* and *H. canis*. Serum from 199 dogs was tested for detection of *B. burgdorferi* antibodies from which 15,58% was positive with titers varying from 1:400 to 1:1600. The higher prevalences were observed in Miguel Pereira (30%), Piraí (21,4%) and Itaguaí (21,1%). These data were similar to those found in endemic areas and indicate the presence of this bacteria in dogs of Rio de Janeiro state.

1. INTRODUÇÃO

O estudo das parasitoses de cães tem grande importância, pois, além de muitos animais adoecerem ou morrerem em conseqüência do parasitismo, podem também atuar como reservatórios de ecto e endoparasitos que podem acometer seres humanos.

No Brasil, os principais hemoparasitos de cães são *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895), *Hepatozoon canis* (James, 1905) e *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935), todos eles tendo como vetor *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Esses agentes, muitas vezes, acometem os animais sem causarem sintomatologia clínica, mas podem, também, causar doença de gravidade variável, chegando à morte. A associação entre esses hemoparasitos é muito comum, favorecendo agravamento do quadro clínico. Além de *R. sanguineus*, outras espécies de carrapatos podem ser encontradas parasitando cães, tais como *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772), *Amblyomma ovale* Koch, 1844 e *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844. *Amblyomma cajennense* é reconhecidamente o principal transmissor de *Rickettsia rickettsii*, contudo, a participação dessas espécies, na transmissão de patógenos aos cães, precisa ser melhor estudada.

Cães e seres humanos podem ser acometidos por *Borrelia burgdorferi* Johnson *et alii*, 1984 *lato sensu*, bactéria causadora da doença de Lyme. O estudo da sua soroprevalência, em cães, pode constituir-se num importante indicador da dispersão desse agente em determinada região.

A população rural do Brasil é pobremente assistida no que diz respeito à saúde e educação, estando sujeita a doenças inexistentes nas grandes cidades. Os cães, nessas áreas, funcionam não só como animais de estimação, convivendo em íntimo contato com seus donos, mas também como animais de trabalho, atuando na guarda e pastoreio. Devido ao contato íntimo entre seres humanos e cães, a saúde desses animais deve ser avaliada para que não sirvam de reservatório de doenças e de ectoparasitos aos homens. Diante disso, torna-se importante o estudo das hemoparasitoses de cães e sua relação com carrapatos vetores.

Considerando todos esses aspectos, o presente projeto teve os seguintes objetivos:

1- Verificar quais espécies compõem a fauna de hemoparasitos de cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro;
2- Identificar as espécies de carrapatos que ocorrem em cães nessas áreas;
3- Relacionar a ocorrência dos hemoparasitos, encontrados em cães, com as espécies de carrapatos identificadas;
4- Pesquisar a ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em soro de cães, empregando técnica de ELISA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895)

Babesia canis (Piana & Galli-Valerio, 1895) é um protozoário da classe Sporozoa que parasita exclusivamente hemácias (WENYON, 1926), tendo sido descrito, pela primeira vez, por Piana & Galli-Valerio, em 1895, na Itália. No vertebrado, reproduz-se, assexuadamente, por divisão binária no interior das hemácias. No carrapato, após reprodução sexuada no intestino do vetor, são formados os esporocinetos que se dirigem a diversos órgãos do carrapato, inclusive ovário e glândula salivar. A infecção do ovário faz com que ocorra transmissão transovariana, e, na glândula salivar, são formados os esporozoítas infectantes, que serão inoculados no vertebrado durante o repasto sangüíneo (SCHEIN *et alii*, 1979; MEHLHORN *et alii*, 1980).

A patogenia da doença, causada por esse protozoário, está relacionada à hemólise intra e extravascular. A gravidade das manifestações clínicas está associada à patogenicidade da cepa de *Babesia*, à intensidade da parasitemia, à resposta imune e à idade do hospedeiro (MARTINOD *et alii*, 1986). As manifestações variam de doença subclínica até doença

hiperaguda, sendo que cães jovens são mais sensíveis e freqüentemente apresentam formas mais graves da doença (BREITSCHWERDT, 1993).

A partir da primeira descrição, *B. canis* foi observada na Europa, África, Ásia, Índia, América do Norte e América do Sul (MARTINOD *et alii*, 1986; UILENBERG *et alii*, 1989). Existem diferentes cepas de *B. canis*, de acordo com a região estudada. Essas cepas variam em função da espécie de carrapato vetor (LEWIS *et alii*, 1996), e em função da patogenicidade, já que umas são mais patogênicas do que outras (SCHETTERS *et alii*, 1997). Assim, REICHENOW (1937) sugeriu o nome *B. canis* para a espécie transmitida pelo *Dermacentor reticulatus* e *Babesia vogeli* para aquela transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Essa nomenclatura antiga ficou esquecida durante muito tempo, contudo, nos últimos anos, alguns autores voltaram a reconhecer a existência de diferentes cepas de *B. canis*, e a sugerir uma nomenclatura trinominal para elas. UILENBERG *et alii* (1989) observaram que cepas de diferentes regiões (França, Norte e Sul da África) eram transmitidas por vetores distintos (*D. reticulatus*, *R. sanguineus* e *Haemaphysalis leachi*, respectivamente) e apresentavam testes, de reatividade cruzada, diferentes, já que as cepas da França e do Norte da África não imunizavam contra a cepa do Sul da África, enquanto a cepa do Norte da África não protegia contra a cepa da França. Os autores sugeriram, então, a seguinte nomenclatura: *Babesia canis canis*, para o agente transmitido pelo *D. reticulatus; Babesia canis vogeli*, quando a transmissão se dá pelo *R. sanguineus;* e *Babesia canis rossi*, quando a transmissão se dá pelo *H. leachi*. A cepa do Sul da África, transmitida pelo *H. leachi*, é considerada a mais patogênica. LEWIS *et alii* (1996), em seus estudos, concordaram com a adoção de uma nomenclatura trinominal.

Esses autores isolaram uma cepa da África do Sul que demonstrou ser transmitida somente por adultos de *H. leachi*, e não pelo *R. sanguineus*, diferindo bastante da cepa estudada por SHORTT (1936), que era transmitida por larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*. SCHETTERS *et alii* (1995) concluíram que essas diferenças fazem com que as vacinas produzidas comercialmente, contra determinada cepa, não protejam contra cepas heterólogas. HAUSCHILD *et alii* (1995), ao purificarem e compararem merozoítos de quatro isolados de *B. canis*, da Hungria, França, África e Egito, demonstraram haver diferenças entre eles quanto à sensibilidade a anti-soros homólogos e heterólogos. O isolado da Hungria, considerado o mais patogênico, foi o que apresentou maior sensibilidade. Os autores encontraram, também, uma proteína, com aproximadamente 12 kDa, que apareceu nos isolados patogênicos da Hungria, França e África do Sul, e não apareceu em um isolado do Egito, considerado pouco patogênico. CITARD *et alii* (1995) revelaram haver grande variedade genética entre vários isolados de *B. canis*. Essa variabilidade foi demonstrada por ZAHLER *et alii* (1998), que discriminaram três genogrupos de *B. canis*, com base em características genotípicas, correspondentes às subespécies propostas anteriormente. Já CARRET *et alii* (1999), distinguiram as três subespécies através da técnica de "Polymerase chain reaction" (PCR), comprovando haver variedade genética entre diferentes isolados de *B. canis*.

Apesar da provável ocorrência de diferentes subespécies, continuaremos a chamar a espécie encontrada no Brasil simplesmente de *B. canis*, pois inexistem estudos que a tenham caracterizado geneticamente.

A prevalência dessa hemoparasitose pode variar de acordo com a técnica utilizada para o diagnóstico (BREITSCHWERDT, 1993), bem como, com região estudada (DEPLAZES *et alii*, 1995). A técnica de esfregaço sangüíneo, apesar da simplicidade de execução e da boa especificidade, é pouco sensível. Nesse caso, a positividade ocorre nos casos agudos com parasitemia elevada. Nos casos crônicos da doença, quando a parasitemia é geralmente muito baixa, são necessárias técnicas mais sensíveis, geralmente imunológicas, para o seu diagnóstico (YAMANE *et alii*, 1993).

A sensibilidade, e/ou especificidade, de cada teste imunológico depende de vários fatores, entre eles, do preparo do antígeno empregado. A fonte de antígeno, para muitos dos testes sorológicos empregados rotineiramente, é o sangue total de animais infectados, colhidos no pico de parasitemia. Em *B. canis*, parasitemias altas são obtidas geralmente em cães esplenectomizados ou imunodeprimidos quimicamente com drogas. São vários os testes sorológicos que podem ser empregados no diagnóstico de anticorpos anti-*Babesia*, sendo que o teste por imunofluorescência indireta (IFI) tem sido amplamente utilizado no diagnóstico de anticorpos, não só de *B. canis* (LEVY *et alii*, 1987; RIBEIRO *et alii*, 1990; TABOADA *et alii*, 1992; VERCAMMEN *et alii*, 1995.), mas também no diagnóstico de outras espécies de *Babesia* (ANDERSON *et alii*, 1980; LINHARES *et alii*, 1992; YAMANE *et alii*, 1993). Segundo ANDERSON *et alii* (1980), animais com infecção patente ou subpatente podem manter alta concentração de anticorpos, o que foi demonstrado pela persistência de títulos elevados na IFI. Para TODOROVIC (1981), títulos de anticorpos $\geq$ a 1:80 são considerados como positivos. Os mesmos autores afirmaram que títulos altos são vistos após o período agudo da infecção, e que os cães que se recuperam,

mas que mantém títulos positivos, são considerados portadores do parasita. FARWELL *et alii* (1982) consideraram títulos positivos, na IFI, a partir de 1:40. LEVY *et alii* (1987) afirmaram que a IFI é um teste confiável para detectar parasitemia latente ou oculta, e títulos ≥ 1:80 são indicativos de infecção, enquanto títulos de 1:40 indicam que ocorreu infecção, mas que o animal eliminou o parasita. Entretanto, é importante que os resultados sorológicos sejam bem interpretados, tendo em vista que animais com infecção aguda e filhotes podem apresentar resultados falso-negativos (BREITSCHWERDT *et alii*, 1983; BOBADE *et alii*, 1989). De acordo com YAMANE *et alii* (1993), cães infectados com *B. canis* apresentaram títulos que variaram de 1:160 a 1:20480. Entretanto, ASSIS (1993) constatou a presença de anticorpos anti-*B.canis* 42 dias após infecção experimental e, mesmo assim, com títulos de no máximo 1:40. VERCAMMEN *et alii* (1995) observaram soroconversão duas a três semanas após infecção, e encontraram, em cães com doença crônica, flutuação nos títulos de anticorpos. PAGÈS *et alii* (1990) dividiram os cães em dois grupos distintos, de acordo com as diferentes respostas apresentadas na infecção por *B. canis*: um grupo de cães cujo sistema imunológico é capaz de eliminar a *B. canis* rapidamente e que apresenta títulos de anticorpos muito baixos; e um segundo grupo onde o protozoário permaneceria nos órgãos profundos, estimulando constantemente o sistema imunológico, fazendo com que esses animais mantivessem altos títulos de anticorpos por muito tempo. WLONIEWSKI *et alii* (1997) tentaram o isolamento de *B. canis* em meio de cultura, e realizaram testes sorológicos pela IFI em 43 animais com esfregaços sangüíneos negativos para *B. canis*. Os autores observaram que enquanto 83,7% apresentaram títulos de anticorpos específicos, somente 14 (33%) dos animais eram portadores desse parasito

(isolamento positivo). Para esses autores, sorologia positiva não é um bom indicativo de infecção latente. BANSAL *et alii* (1985) diagnosticaram, na Índia, 5,4% de cães com esfregaços positivos para *B. canis*, enquanto que utilizando técnicas sorológicas, esse resultado subiu para 37%. Na Malásia, RAJAMANICKAM *et alii* (1985) encontraram somente 1,1% de positividade (43/ 4084) para *B. canis*. Os autores ressaltaram que a espécie de *Babesia*, mais freqüente em cães naquela região, foi *Babesia gibsoni*. BOCH (1985) encontrou, no sul da Alemanha, 29,4% de cães positivos na IFI para *B. canis*, em 1983, e 45,33% de positivos, em 1984. LEVY *et alii* (1987) detectaram, em 600 cães da Carolina do Norte, Estados Unidos da América (EUA), 3,8% de positividade no teste de IFI. Na Nigéria, BOBADE *et alii* (1989) observaram prevalência de 43% (125/ 287) de cães soropositivos para *B. canis*. ABDULLAHI *et alii* (1990), examinando esfregaços sangüíneos corados por Giemsa, observaram que 70% dos cães positivos tinham menos de um ano de idade. Entretanto, TABOADA *et alii* (1992) diagnosticaram 46,1% de cães da raça Grayhound, positivos para *B. canis*, no teste de IFI, sendo que a positividade aumentou com a idade dos cães; desse modo, animais com idade inferior a 2 anos tiveram positividade de 2,9%; animais com 2 a 5 anos, 29,4% e aqueles com idade superior a 5 anos, 46,7%. Os autores consideraram positivos animais com títulos superiores a 1:80, tendo esses títulos alcançado 1:20480. No Zimbabwe, mesmo utilizando-se diagnóstico pelo esfregaço sangüíneo, a ocorrência de *B. canis* foi alta, chegando a 26% (MATTHEWMAN *et alii*, 1993). Na Califórnia, EUA, a soroprevalência para *B. canis* variou até 13%, em várias regiões pesquisadas, contudo, não foram detectados parasitos nos esfregaços sangüíneos dos cães positivos (YAMANE *et alii*, 1994). Em contrapartida, DEPLAZES *et alii* (1995)

encontraram menos de 1% de animais com títulos de anticorpos para *B. canis*, pela IFI, na Suíça. KORDICK *et alii* (1999) observaram 16 de 27 (59,2%) animais com sorologia positiva para *B. canis*, sendo que desses 16, sete foram positivos também pelo PCR.

No Brasil, a piroplasmose canina foi estudada pela primeira vez por PESTANA (1910). Apesar desse agente estar disseminado nas diferentes regiões do país, existem poucos estudos de prevalência. PARAENSE & VIANNA (1949) examinaram esfregaços sangüíneos de 100 cães de rua, da cidade do Rio de Janeiro, e observaram 14% de positividade. DELL-PORTO (1986), examinando cães da cidade de São Paulo, observaram 42,4% de animais sororreagentes, no teste de IFI. Mais recentemente, RIBEIRO *et alii* (1990) determinaram a freqüência de cães soropositivos para *B. canis*, pela imunofluorescência indireta, em 127 cães de Belo Horizonte, encontrando 85 (66,9%) com reação positiva. É importante que outros estudos sejam conduzidos, em diferentes regiões, para que tenhamos uma imagem real da situação desse hemoparasito no nosso país.

2.2- Hepatozoon *canis* (James, 1905)

Hepatozoon canis (James, 1905) é outro protozoário, transmitido pelo carrapato *R. sanguineus*, que pode ser encontrado no Brasil. Foi observado, pela primeira vez, por Bentley, em 1904, na Índia (BENTLEY, 1905), e descrito por James, em 1905 (JAMES, 1905 a/ 1905 b). Os carrapatos infectam-se ao ingerir sangue de cães contendo gametócitos no interior de neutrófilos ou monócitos. No tubo digestivo do vetor, ocorre a fusão dos gametas com a posterior formação do oocineto. Este, como tem mobilidade, atravessa a

parede intestinal caindo na hemocele, onde se desenvolve, chegando a oocisto. O oocisto, quando maduro, passa a apresentar vários esporocistos contendo esporozoítos (CRAIG, 1993). O cão se infecta ao ingerir o carrapato com os oocistos maduros na sua hemocele. Nos cães, esse protozoário apresenta uma fase tecidual e uma fase sangüínea. Os esporozoítos liberados dos oocistos, após a ingestão do carrapato vetor, penetram na parede intestinal e são transportados, via sangüínea, até o baço, fígado, medula óssea, pulmões e músculos. Nesses locais, multiplicam-se, formando merontes e cistos. Merozoítos, liberados dos merontes, penetram nos monócitos e neutrófilos, onde se transformam em gametócitos. Na fase sangüínea, portanto, pode-se encontrar gametócitos no interior de neutrófilos e monócitos (BARTON *et alii*, 1985; MURATA *et alii*, 1993c; CRAIG, 1993). Durante algum tempo, persistiu a dúvida se monócitos eram infectados por esse protozoário, ou se isso ocorria somente em neutrófilos. Segundo IBRAHIM *et alii* (1989), neutrófilos, parasitados por esse protozoário, são deficientes em uma enzima, mieloperoxidase, que reduz a capacidade fagocítica dessas células. MAKIMURA *et alii* (1991) identificaram monócitos como as células parasitadas por *H. canis*, sendo que estas estariam alteradas morfologicamente. MURATA *et alii* (1993c) concluíram que tanto neutrófilos, quanto monócitos podem ser parasitados, ocorrendo, em ambas as células, alterações das características morfológicas e citoquímicas. Segundo esses autores, os merozoítos de *Hepatozoon* invadem as células provavelmente ainda no estágio mieloblástico.

Hepatozoon canis já foi descrito em diversas regiões do mundo, a exemplo da África (MCCULLY *et alii*, 1975; EZEOKOLI et al, 1983), Europa (JAUREGUI LATORRE &

LOPEZ GIRON, 1995; HERVAS *et alii*, 1995), Israel (BANETH *et alii*, 1995; ELIAS & HOMANS, 1988), Japão (MURATA *et alii*, 1991) e EUA (CRAIG *et alii*, 1978).

No Brasil, *H. canis* foi diagnosticado em diversos estados, incluindo Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (MASSARD, 1979; MUNDIM *et alii*, 1992, 1994; O´DWYER *et alii*, 1997; GONDIM *et alii*, 1998).

Apesar dos diversos estudos sobre esse parasita, ainda ocorrem divergências quanto à sua patogenicidade. Alguns autores consideram as infecções por *H. canis* assintomáticas (MCCULLY *et alii*, 1975), e que o encontro de gametócitos, na circulação, é ocasional, atribuindo, a outros agentes infecciosos, eventuais sintomas clínicos observados em cães portadores (OGUNKOYA *et alii*, 1981; GOSSETT *et alii*, 1985; MURATA *et alii*, 1991; HARMELIN *et alii*, 1992). *Hepatozoon canis* já foi diagnosticado associado a *Toxoplasma gondii* (HARMELIM et al, 1992; MUNDIM *et alii*, 1994), *Ehrlichia canis* (MUNDIM *et alii*, 1994, O'DWYER *et alii*, 1997; GONDIM *et alii*, 1998), *Babesia canis* (O'DWYER *et alii*, 1997; GONDIM *et alii*, 1998), *Haemobartonella canis* (O'DWYER *et alii*, 1997) e parvovírus (BANETH *et alii*, 1997). A associação, entre esses parasitas, leva a um quadro clínico mais grave do que quando ocorre parasitismo isolado (BANETH *et alii*, 1997). Entretanto, alguns cães exibem parasitemia elevada e doença grave caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, anemia, corrimento ocular, fraqueza dos membros posteriores, sintomas característicos de doença de caráter crônico debilitante (EZEOKOLI *et alii*, 1983; ELIAS & HOMANS, 1988; IBRAHIM *et alii*, 1989; MUNDIM *et alii*, 1994, GONDIM *et alii*, 1998). HERVAS *et alii* (1995) descreveram um caso fatal de hepatozoonose em um filhote. BANETH & WEIGLER (1997) relataram diferenças nas alterações clínicas, quando

foram comparados cães positivos para *H. canis* e cães negativos, e, mesmo, entre cães positivos com parasitemia alta e animais com parasitemia baixa. As variáveis avaliadas foram: temperatura corporal, hematócrito, número total de hemácias e concentração de hemoglobina. Animais com parasitemia elevada apresentaram emaciação, letargia e alterações bioquímicas do soro.

O primeiro caso de *H. canis*, diagnosticado no Japão (MURATA *et alii*, 1991), ocorreu em um cão com paralisia dos membros posteriores devido à proliferação óssea. Essa mesma alteração, proliferação óssea, foi observada por CRAIG *et alii* (1978), GAUNT *et alii*, (1983), PANCIERA *et alii* (1997, 1999) e MACINTIRE *et alii* (1997), em cães positivos para *H. canis,* nos EUA, associada a outros sinais clínicos como febre intermitente, rigidez, miastenia, inapetência e neutrofilia.

Nos EUA, a doença clínica parece ser mais grave do que em outros países. Recentemente, pesquisadores, desse país, propuseram a criação de uma nova espécie de *Hepatozoon*, denominada *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson *et alii*, 1997 (VINCENT-JOHNSON *et alii*, 1997), baseados em diferenças clínicas observadas em cães americanos infectados com *H. canis*. Nesses animais, ocorreram diferenças na apresentação clínica, com quadro clínico grave, com predomínio de alterações musculares e ósseas, enquanto que, em outros países, a infecção tende a ser subclínica, e com alterações de ordem geral; morfológicas (localização e estrutura dos cistos tissulares que são encontrados preponderantemente na musculatura, diferindo da espécie observada em outros países, onde os cistos são encontrados no baço, linfonodos, pulmões e fígado) e biológicas (outro vetor que não o *R. sanguineus*). Essas diferenças justificariam a criação de uma nova espécie

(VINCENT-JOHNSON *et alii*, 1997b; PANCIEIRA *et alii*, 1997; PANCIEIRA *et alii*, 1999).

O diagnóstico de *H. canis* baseia-se rotineiramente no encontro de gametócitos em esfregaços sangüíneos (CRAIG *et alii*, 1978; ELIAS & HOMANS, 1988; IBRAHIM *et alii*, 1989). EZEOKOLI *et alii* (1983) diagnosticaram 22% (78 em 354) de cães positivos para *H. canis* por meio de esfregaços sangüíneos. Os autores sugeriram que a infecção por *H. canis* pode produzir doença clínica mais freqüentemente do que se pensava anteriormente. Na Índia, BANSAL *et alii* (1985), após examinarem 476 esfregaços sangüíneos, encontraram 2,7% com gametócitos. Em Israel, ELIAS & HOMANS (1988) diagnosticaram gametócitos de *H. canis* em 6 de 66 cães examinados, e a sintomatologia incluía febre, anemia, anorexia e fraqueza dos membros posteriores. A parasitemia dos neutrófilos circulantes variou de 6 a 43%, e dois dos animais apresentaram infecção concomitante com *E. canis*. IBRAHIM *et alii* (1989) observaram gametócitos, em 1 a 9% dos neutrófilos circulantes, enquanto BANETH *et alii* (1995) encontraram 60% dos neutrófilos parasitados. Porém, em alguns casos, não foi possível observar gametócitos, seja devido à baixa parasitemia ou à parasitemia intermitente. Nos casos onde os gametócitos sangüíneos são raros, pode proceder-se à biópsia muscular (GAUNT *et alii*, 1983; MACINTIRE *et alii*, 1997), com encontro de cistos entre a musculatura. Ambas as técnicas podem ser utilizadas, facilitando o diagnóstico (PANCIEIRA *et alii*, 1997). HARMELIM *et alii* (1992), ao realizarem exame pós-mortem, em um filhote, detectaram esquizontes, no baço, e linfonodos, os quais foram identificados como sendo de *H. canis*. BANETH *et alii* (1995), examinando animais com alta parasitemia, em Israel, encontraram parasitos, nos pulmões,

medula óssea, pleura e cavidade abdominal, mas não na musculatura. Já VINCENT-JOHNSON *et alii* (1997a) afirmaram que, na hepatozoonose americana, gametócitos são raramente encontrados em esfregaços sangüíneos e, conseqüentemente, o método de diagnóstico mais consistente é a biópsia muscular, já que, nesses animais, os cistos se localizam preferencialmente na musculatura (DROLESKEY *et alii*, 1993).

No Brasil, os relatos de *H. canis* vêm sendo feitos esporadicamente, principalmente como achados casuais em exames de laboratório. Entretanto, MASSARD (1979) realizou um estudo epidemiológico, em cães de áreas urbanas e rurais, utilizando-se de diagnóstico por esfregaços sangüíneos, e observou que o parasitismo foi mais freqüente em cães de áreas rurais: 31,58% (36/ 114); em comparação com cães de áreas urbanas: 4,48% (3/ 67). MUNDIM *et alii* (1992; 1994) descreveram 22 casos de cães com hepatozoonose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, MG. GONDIM *et alii* (1998) também descreveram 8 casos diagnosticados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, SP.

SHKAP *et alii* (1994) desenvolveram um teste de imunofluorescência indireta (IFI), em que utilizaram como antígeno leucócitos parasitados de um animal com parasitemia elevada. Dos soros de 10 cães com gametócitos circulantes, nove mostraram-se positivos à IFI; e de sete cães sem parasitemia, mas com relato de infecção prévia, seis apresentaram anticorpos anti-*H. canis*. Ao comparar os resultados entre o diagnóstico, por meio de esfregaços sangüíneos, e o exame de IFI, BANETH *et alii* (1996) observaram gametócitos somente em 1% dos cães pesquisados, com parasitemia variando de 1 a 10%, enquanto que, no teste de IFI, 33% dos animais (53 em 160) apresentaram-se positivos. Segundo os

autores, a presença de anticorpos, sem a detecção do parasito, pode resultar de infecção prévia já debelada, infecção persistente com parasitemia intermitente, ou número muito pequeno de gametócitos na circulação. Após infecção experimental, os gametócitos apareceram na circulação do 28° ao 43° dia, com média de 34 dias. Por outro lado, títulos de IgM apareceram, em média, no 26° dia, e títulos de IgG, no 29° dia (BANETH *et alii*, 1998 b). INOKUMA *et alii* (1998) examinaram sorologicamente cães em Okayama, Japão, e não observaram nenhum animal positivo, enquanto que, INOKUMA *et alii* (1999), ao examinarem 450 cães, em Yamaguchi, encontraram 4,2% de resultados positivos para *H. canis*.

Em relação à transmissão, CHRISTOPHERS (1906,1907) já descrevia *R. sanguineus* como vetor de *H. canis*. Desde então, outros pesquisadores também conseguiram transmitir esse protozoário, a cães, após a ingestão de adultos de *R. sanguineus* infectados com *H. canis* (NORDGREEN *et alii*, 1984; BANETH *et alii*, 1998 b). BANETH *et alii* (1998 b) conseguiram transmitir a infecção, a cães, por via oral, após ingestão de adultos de *R. sanguineus*, que haviam se alimentado, como ninfas, em animais com alta parasitemia (53%). Contudo, em algumas regiões onde o *H. canis* ocorre, *R. sanguineus* não é o carrapato mais freqüente. Desse modo, MURATA *et alii* (1993b) propuseram que *Haemaphysalis longicornis* pudesse também ser vetor, por ser a espécie preponderantemente encontrada, em cães portadores de *H. canis*, no Japão. MURATA *et alii* (1995) conseguiram confirmar sua hipótese, ao encontrarem oocistos, em adultos de *H. longicornis* e em ninfas de *Haemaphysalis flava*, retirados de cães portadores. Nos EUA, NORDGREEN *et alii* (1984) conseguiram transmitir *H. canis* (= *H. americanum*) com *R.*

sanguineus, entretanto, VINCENT-JOHNSON *et alii* (1997b) acreditavam ser *A. maculatum* o principal vetor naquele país. Posteriormente, MATHEW *et alii* (1998) testaram a transmissão do *H. americanum* (=*H. canis*) com quatro espécies de carrapatos, sendo elas, *R. sanguineus*, *A. americanum*, *A. maculatum* e *Dermacentor variabilis*. Somente os cães que ingeriram *A. maculatum* se infectaram. De 88 carrapatos dissecados, 85 apresentavam oocistos de *H. americanum*, na hemocele, demonstrando a facilidade que essa espécie tem para infectar-se. Posteriormente, PANCIEIRA *et alii* (1999) também conseguiram transmitir, esse protozoário, a cães que ingeriram *A. maculatum*, confirmando sua competência vetorial.

Além da transmissão horizontal por carrapatos, MURATA *et alii* (1993a) observaram que 23 de 29 cães neonatos (79,3%), de um total de seis ninhadas, apresentaram gametócitos (0,02 a 0,4% dos leucócitos) e merontes tissulares, 16 a 60 dias após o nascimento. Segundo os autores, as cadelas eram portadoras de *H. canis* e os filhotes nasceram e foram mantidos em condições livres de carrapatos, confirmando assim a transmissão congênita.

2.2- *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935)

Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard, 1935), embora pertencente ao grupo das rickettsias, é uma espécie intimamente relacionada aos hemoprotozoários, devido ao fato de ter transmissão associada ao carrapato *R. sanguineus*. A infecção, no cão, inicia-se a partir dos corpos elementares que penetram nos monócitos. Esses se multiplicam por divisão

binária, formando os corpos iniciais que posteriormente darão origem à mórula (MCDADE, 1990). No *R. sanguineus*, inclusões intracitoplasmáticas, contendo de um a 80 corpos elementares, podem ser observadas nas células intestinais, hemócitos e glândula salivar. O ovário não é infectado, não ocorrendo, portanto, transmissão transovariana (SMITH *et alii*, 1976). O carrapato transmite esse agente nas suas fases de ninfa e adultos, após transmissão trasnsestadial (MATHEW *et alii*, 1996). JOHNSON *et alii* (1998) transmitiram experimentalmente *E. canis* através de ninfas e adultos de *Dermacentor variabilis*, tendo sido a primeira vez que se demonstrou que outra espécie de carrapato, além de *R. sanguineus*, pode transmitir *E. canis* a cães.

No cão, o parasitismo por *E. canis* caracteriza-se pela formação de mórulas no interior de monócitos e linfócitos, sendo estas, as únicas formas encontradas nos hospedeiros vertebrados (COLES, 1953).

Apesar de ter sido descrita em 1935 (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935), e ter sido documentada no Mediterrâneo, Índia e África (EWING, 1969), o avanço, nos estudos sobre *E. canis*, só ocorreu a partir de 1970, quando aproximadamente 300 cães militares, dos EUA, morreram, no Vietnã, em decorrência dessa parasitose. A doença, conhecida como Pancitopenia Tropical Canina (PTC), apresentava-se com um quadro hemorrágico, caracterizando-se por febre, debilidade, epistaxis, anemia e leucopenia (WALKER & DUMLER, 1996). HUXSOLL *et alii* (1969,1970) detectaram mórulas de *E. canis*, no sangue e tecidos de cães com PTC, e concluíram que essa última era uma forma grave de ehrlichiose. No Brasil, ehrlichiose canina caracteriza-se por provocar um quadro febril, associado à apatia, anorexia e desidratação, não sendo freqüente quadros hemorrágicos

intensos. A doença pode evoluir para fase subclínica, ou então para óbito (ALMOSNY, 1998).

O diagnóstico de *E. canis*, por meio de esfregaços sangüíneos, com a detecção de mórulas, no interior de monócitos, apresenta baixa sensibilidade, pois as mórulas só aparecem na fase aguda da doença e, mesmo assim, em pequena quantidade (SEAMER & SNAPE, 1972; KUEHN & GAUNT, 1985). Por isso, o diagnóstico de erlichiose tem sido feito principalmente com auxílio de técnicas sorológicas (STEPHENSON & RISTIC, 1978; KEEFE et al, 1982; MATTHEWMAN *et alii*, 1993 a).

Vários estudos foram realizados para determinar a prevalência de *E. canis*, em cães militares (STEPHENSON & RISTIC, 1978; KEEFE *et alii*,1982; DAVOUST *et alii*, 1986; DAVOUST & PARZY, 1989; BROUQUI *et alii*, 1991). De acordo com STEPHENSON & RISTIC (1978), cães Pastores Alemães, habitualmente utilizados para fins militares, são mais suscetíveis (21%) do que outras raças (8%). KEEFE *et alii* (1982) observaram que 11% dos cães militares, e 57% dos cães civis, nos EUA, apresentaram anticorpos anti-*E. canis*, no teste de IFI. PARZY *et alii* (1991) observaram, no Senegal, 78% de cães militares, contra 37% dos cães civis, com sorologia positiva no teste de IFI. Ainda na África, BROUQUI *et alii* (1991) detectaram 50% de cães positivos utilizando-se do teste de IFI. MAGNARELLI & ANDERSON (1993) analisaram soro de 60 cães, do nordeste dos EUA, com resultados de 11,7% de positividade no teste de IFI. MATTHEWMAN *et alii* (1993 a) observaram que, no Zimbabwe, 52% dos cães examinados apresentaram anticorpos anti-*E. canis*, no teste de IFI, enquanto nenhum dos animais apresentou mórulas típicas, nos esfregaços sangüíneos. Também MATTHEWMAN *et alii* (1993b) detectaram prevalência de 42%, em

cães do Zimbabwe, sem que os mesmos apresentassem evidência hematológica ou bioquímica de ehrlichiose canina. Em Israel, a soroprevalência de *E. canis* foi de 63% dos cães, no teste de IFI (BANETH *et alii*, 1998 a). PRETORIUS & KELLY (1998) encontraram, na África do Sul, 42% dos cães com títulos de anticorpos contra *E. c*anis, no teste de IFI, e a prevalência foi maior em animais de regiões pobres e densamente povoadas.

No Brasil, *E. canis* foi diagnosticada por esfregaços sangüíneos, em Belo Horizonte (COSTA *et alii*, 1973), e, em cães da Polícia Militar do Rio de Janeiro, por CARRILLO *et alii* (1976); desde então, tem sido um achado freqüente em animais doentes, examinados em clínicas e hospitais veterinários de vários estados. Entretanto, não há estudos soroepidemiológicos que tenham determinado a prevalência desse agente no nosso país.

A partir de 1986, com a descrição do primeiro caso de erlichiose humana (MAEDA *et alii*, 1987), ressurgiu o interesse sobre o gênero *Ehrlichia*, já que os casos humanos diagnosticados reagiam sorologicamente à *E. canis* (MAEDA *et alii*, 1987; PETERSEN *et alii*, 1989; ROHRBACH *et alii*, 1990; MORAES *et alii*, 1991). MCDADE (1990) revelou que aproximadamente 10% dos casos suspeitos, e não confirmados de tifo exantemático (Febre das Montanhas Rochosas ou Febre Maculosa), atribuídos à *Rickettsia rickettsii*, foram, na verdade, casos de erlichiose humana. Recentemente, estudos moleculares do agente causador da erlichiose humana revelaram tratar-se de uma espécie nova, *E. chaffeensis*, bastante similar à espécie canina, *E. canis* (ANDERSON *et alii*, 1991).

2.4- *Borrelia burgdorferi* Johnson *et alii*, 1984 *lato sensu*

Outra importante doença transmitida por carrapatos, que acomete seres humanos e animais, é a borreliose de Lyme, causada pelo espiroqueta *Borrelia burgdorferi* Johnson *et alii*, 1984 *lato sensu* (JOHNSON *et alii*, 1984). Essa é a doença humana transmitida por carrapatos mais estudada na atualidade, com aproximadamente 2000 casos diagnosticados/ano, na América do Norte (HOSKINS, 1991b). Os vetores principais são carrapatos *Ixodes scapularis* (=*Ixodes dammini*) e *I*xodes *pacificus*, nos EUA, e *Ixodes ricinus,* na Europa (MCKENNA *et alii*, 1995).

Os principais sintomas clínicos, associados à borreliose canina, envolvem o comprometimento das articulações com um quadro de artrite progressiva (LISSMAN *et alii*, 1984; LEVY & DREESEN, 1992). Após infecção experimental, cães desenvolveram artrite aguda nas articulações próximas ao ponto de fixação dos carrapatos infectados, tendo período de incubação de 68 dias. Os autores concluíram que *B. burgdorferi* dissemina-se através dos tecidos, após a inoculação pelo carrapato, e produz infecção persistente, de difícil tratamento, podendo haver nova manifestação da doença em animais imunossuprimidos (STRAUBINGER *et alii*, 1998). O diagnóstico da borreliose de Lyme é feito principalmente por meio de testes sorológicos, associado a sintomas clínicos e fatores epidemiológicos, já que, diferentemente das hemoparasitoses já citadas, seu encontro, em líquidos orgânicos e secreções, é difícil (STEERE, 1989). Atualmente, com a utilização da técnica de PCR, foi possível detectar DNA de *B. burgdorferi,* em urina de cães (BAUERFEIND *et alii*, 1998) e em amostras de membranas sinoviais, pele, fluido

cerebroespinhal, bexiga, coração e medula óssea de cães com infecção sintomática (HOVIUS *et alii*, 1999). Um complicador do uso de técnicas sorológicas, para o diagnóstico de doença de Lyme, em cães provenientes de países onde ocorre vacinação contra *B. burgdorferi*, é a ocorrência de reações cruzadas com antígenos vacinais. Entretanto, a técnica de Western immunoblotting pode distinguir entre infecção natural e vacinação (GAUTHIER & MANSFIELD, 1999).

Estudos soroepidemiológicos têm sido conduzidos no mundo inteiro, para determinação da prevalência desse agente, em cães, e a importância desses animais, na epidemiologia da doença de Lyme. MAGNARELLI *et alii* (1985), ao estudarem cães de uma área endêmica, para doença de Lyme humana, nos EUA, encontraram 28,6% (60/ 210) soropositivos, em contraste com uma área de baixa prevalência humana, em que nenhum animal apresentou anticorpos contra *B. burgdorferi*. Nos EUA, as prevalências encontradas em cães variaram de 1,7% (WRIGHT *et alii*, 1997) a 53,4% (LEVY & MAGNARELLI, 1992), dependendo da região estudada. No Japão, AZUMA *et alii* (1994) encontraram 16 soropositivos, em 21 cães examinados, sendo que 13 apresentavam sintomatologia clínica compatível com borreliose de Lyme. Na Bélgica, também já foram descritos casos da doença em cães (MCKENNA *et alii*, 1995). ROJO VASQUEZ (1997) observou somente 2,1 % de positividade, pela IFI, sendo a prevalência superior em cães pastores. Na Eslováquia, 50% dos cães pesquisados, apresentavam anticorpos anti-*B. burgdorferi sensu stricto*, e a prevalência foi maior em cães de caça (STEFANCIKOV *et alii*, 1998). Em algumas regiões, não foram encontrados cães com sorologia positiva para essa bactéria (CICERONI *et alii*,1997; GOLUBIC *et alii*, 1998). GREENE (1990) comentou que, em áreas endêmicas,

mais de 50% da população canina pode ser assintomática, mesmo sendo soropositiva, sugerindo que títulos de anticorpos não indicam necessariamente a presença de doença, mas, que sorologia positiva deve ser considerada como evidência de exposição ao agente. O estudo da soroprevalência, em cães, também pode constituir-se num importante indicador da dispersão da doença (HOSKINS, 1991b). A presença de cães infectados pode significar aumento do risco de exposição humana à borrelia. LINDENMAYER *et alii* (1991) investigaram a relação entre incidência de casos humanos de Doença de Lyme e a soroprevalência de anticorpos anti- *B. burgdorferi* em cães. Os autores concluíram que a prevalência de anticorpos anti- *B. burgdorferi*, em cães, oferece uma estimativa confiável do risco potencial de se adquirir esse agente. Corroborando essa possibilidade, MATHER *et alii* (1994) demonstraram a contaminação de 78% de ninfas de *I. scapularis*, que se alimentaram em cães positivos, na fase de larva, e HOVIUS *et alii* (1998) observaram infecção por *Borrelia* spp., em 138 *I. ricinus*, utilizando-se da técnica de PCR. HOVIUS *et alii* (1999) observaram que, em cães, os títulos de anticorpos anti-*B. burgdorferi,* detectados pelo método de ELISA, aumentaram após a primeira exposição a carrapatos, caindo no período de ausência desses artrópodes, e voltando a elevarem-se após subseqüentes exposições.

No Brasil, a borreliose de Lyme já foi diagnosticada, em humanos (YOSHINARI *et alii*, 1997) e em animais (FONSECA *et alii*, 1996). JOPPERT (1996), ao estudar a ocorrência da doença de Lyme, em cães, no Brasil, encontrou 9,7% de cães sororreagentes, pelo teste de ELISA (23/ 237), sendo que desses 69,9%, possuíam histórico de contato prévio com carrapatos. SOARES *et alii* (1999a) encontraram 20% de animais positivos ao

ELISA indireto, em 150 cães de área urbana procedentes de municípios da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. Essa prevalência é semelhante à encontrada em regiões endêmicas, entretanto, ainda não se sabe qual é a espécie de carrapato que transmite essa espiroqueta no Brasil.

2.5- Carrapatos

Várias espécies de carrapatos podem ser encontradas parasitando cães, de acordo com a região estudada. A espécie mais associada ao cão, principalmente em áreas urbanas e peri-urbanas, é o carrapato *R. sanguineus* (COSTA *et alii*, 1962; FLECHTMANN, 1990). FREIRE (1972) encontrou uma grande diversidade de espécies de carrapatos, em cães do Rio Grande do Sul, tendo observado a presença de *Amblyomma tigrinum* Koch, 1884; *Amblyomma ovale* Koch, 1884; *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), *Amblyomma humerale* Koch, 1884; *Amblyomma incisum* Newmann, 1906; *Boophilus microplus* Canestrini, 1890; e *R. sanguineus* (Latreille, 1806). MASSARD *et alii* (1981) constataram que cães criados em áreas urbanas eram parasitados principalmente por *R. sanguineus*, enquanto que cães de áreas rurais apresentavam, preponderantemente, espécies de *Amblyomma* (*A. ovale, A. tigrinum, A. aureolatum* (Pallas, 1772) e *A. cajennense*). Contudo, RIBEIRO *et alii* (1997) relataram a ocorrência de *A. aureolatum*, em cães de rua de Porto Alegre, indicando que essa espécie pode adaptar-se ao meio urbano. Segundo ARAGÃO & FONSECA (1961b), *A. aureolatum* parasita habitualmente o cão de cidades do interior, sendo freqüentemente encontrado sobre animais silvestres da mesma região; por

outro lado, *A. ovale* é uma espécie de hábitos nitidamente silvestres. LABRUNA *et alii* (1999), além de *A. cajennense* e *A. ovale*, encontraram também *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1884, parasitando cães no estado do Pará.

Carrapatos do gênero *Amblyomma* podem transmitir diversos agentes patogênicos para cães e seres humanos. Assim, *A. americanum* é vetor potencial de ehrlichiose humana (ANDERSON *et alii*, 1993), já que transmitem *E. chaffeensis* para animais (EWING *et alii*, 1995), nos EUA, e podem transmitir *B. burgdorferi* a cães (MATHER *et alii*, 1994). Também *A. maculatum* é o principal vetor de *H. americanum* para os cães (MATHEW *et alii*, 1998). BILLINGS *et alii* (1998) isolaram do grupo da Febre maculosa de carrapatos *A. cajennense*, nos EUA. No Brasil, rickettsias do grupo da Febre Maculosa foram isoladas de *Amblyomma cooperi* Nuttall & Warburton, 1908 (LEMOS *et alii*, 1996), bem como de *A. cajennense* (LEMOS *et alii*, 1997), tornando essas espécies de carrapatos potencialmente perigosas para os seres humanos.

O conhecimento da fauna ixodológica de cães de uma determinada região é importante para a adoção de medidas de controle, tanto das infestações, como das doenças por eles transmitidas. Além disso, há que se considerar dois aspectos que são de fundamental importância na ecologia dos agentes patogênicos transmitidos por carrapatos: em primeiro lugar, as várias espécies de carrapatos têm diferentes potenciais de transmissão de agentes patogênicos; em segundo, carrapatos com baixa especificidade parasitária, parasitas habituais de cães e de outras espécies, especialmente *Amblyomma*, podem também parasitar o homem, favorecendo a transmissão de doenças a esse último. Portanto, o estudo

da ecologia das doenças, transmitidas por carrapatos, e suas inter-relações é uma área ampla de pesquisa, na qual, muitas questões carecem de investigação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local dos experimentos

A coleta de material foi realizada em sete municípios do Estado do Rio de Janeiro, que distribuem-se em três mesorregiões classificadas segundo divisão político-administrativa da Fundação CIDE (1997): Seropédica, Itaguaí, Paracambi e Mangaratiba, que fazem parte da Mesorregião Metropolitana; Barra do Piraí e Piraí, que fazem parte da Mesorregião do Médio Paraíba e Miguel Pereira, da Mesorregião Centro Sul-fluminense. Foram escolhidas áreas afastadas dos centros urbanos, com características rurais e com presença de mata secundária. Dentro de um mesmo Município, foram feitas amostragens, em mais de uma localidade, de acordo com as características da região.

O processamento do material e o diagnóstico sorológico para *Borrelia burgdorferi lato sensu* foram executados nos Laboratórios do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

O diagnóstico parasitológico de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, por meio de esfregaços sangüíneos, e o diagnóstico sorológico de *Babesia canis*, por

imunofluorescência indireta (IFI), foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, São Paulo.

3.2- Coleta e processamento do material

Foram examinados 250 cães, com número variável de animais por região em função das seguintes características: densidade da população canina e dispersão das moradias. Foram confeccionados esfregaços sangüíneos de sangue periférico, obtidos a partir da punção de vasos de pequeno calibre da orelha. Os esfregaços foram secos ao ar, fixados em metanol por três minutos e corados pelo Giemsa [1] a 10% por 45 minutos. As lâminas foram examinadas, principalmente na região da franja do esfregaço, área onde se concentram as hemácias parasitadas e os leucócitos, em microscópio com aumento de 1000x.

Nos esfregaços sangüíneos, procurou-se observar a presença de *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Ehrlichia canis*, em hemácias, neutrófilos e mononucleares, respectivamente. Os parasitas foram identificados de acordo com as descrições de WENYON (1926); JAMES (1905a) e DONATIEN & LESTOQUARD (1935). O cálculo da parasitemia de *H. canis* foi feito contando-se o número de células infectadas em 200 neutrófilos ou monócitos (GONDIM et al., 1998).

Os soros foram obtidos a partir de sangue colhido da veia jugular. Após a colheita, o sangue foi colocado em suporte inclinado e deixado para coagular espontaneamente. No laboratório, o soro foi extraído após centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos.

---

[1] Merck

Posteriormente foram divididos em alíquotas e estocados em tubos tipo eppendorf, a -20 °C, até o momento do uso. Os soros foram utilizados na realização de diagnóstico sorológico de *B. canis* por IFI e no diagnóstico sorológico de *Borrelia burgdorferi* por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA).

3.3- Realização do teste de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis*

3.3.1- Cães utilizados no preparo do antígeno

Foram utilizadas quatro cadelas, sem raças definidas, adultas, cedidas pelo Biotério Central da UNESP-Botucatu. Os animais foram mantidos em canis, alimentados com ração comercial, e água à vontade. As cadelas ficaram em adaptação por 20 dias, quando então foram submetidas à esplenectomia. Após a cirurgia, foram confeccionados esfregaços sangüíneos diariamente de cada cadela, com resultados negativos. Quinze dias após a cirurgia, os animais receberam 2 ml de sangue positivo para *B. canis*. Juntamente com o sangue infectado, receberam doses imunossupressoras de corticosteroides (Acetato de Dexametasona 0,50 mg/comprimido *[2]) e Tetraciclina 2 mg/Kg [3], para não haver risco de infecção concomitante com riquetsioses. Somente um animal apresentou parasitemia elevada (15%) e teve seu sangue coletado para a preparação do antígeno.

---

[2] Azium
[3] Terramicina 500 mg

3.3.2- Preparo do Antígeno (Ag)

Aproximadamente 15 ml de sangue foram coletados em citrato de sódio e centrifugados a 3000 rpm/15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante e a capa leucocitária foram descartados. O sangue foi lavado três vezes, em solução tampão PBS (pH 7,2), para retirada completa do plasma e capa leucocitária. Solução PBS foi adicionada ao sangue, em quantidade suficiente para permitir a confecção dos esfregaços sangüíneos em lâminas novas, previamente desengorduradas e secas. Os esfregaços, quando corados pelo método de Giemsa, apresentaram média de oito parasitos por campo microscópico no aumento de 1000x. Os esfregaços foram secos e embrulhados em papel vegetal e papel alumínio e mantidos a - 20°C até o momento do uso.

3.3.3- Reação de Imunofluorescência indireta (IFI)

Para serem usadas nas provas de IFI, as lâminas com Ag foram retiradas do freezer e deixadas em temperatura ambiente, por 30 minutos, para secarem. Depois de secas, pequenos círculos foram demarcados com esmalte vermelho sobre o esfregaço. Os soros controle positivo, negativo e os soros a serem testados foram diluídos ao dobro de 1:40 até 1:160 em solução tampão PBS. A definição da diluição foi feita após testes, onde se iniciou com diluições a 1:10, até estabelecer-se a linha de corte em 1:40. Os soros diluídos foram colocados sobre o esfregaço, nos poços demarcados sobre as lâminas, e foram incubados

em câmara úmida a 37°C/1hora. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a três lavagens seqüenciais, de cinco minutos, em solução tampão PBS. Após secagem, foi adicionado, em cada poço conjugado anti-cão marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma), diluído a 1:20 em azul de Evans (1:10). As lâminas foram novamente incubadas, em câmara úmida, a 37°C/1h. Após incubação, sofreram novamente três lavagens de cinco minutos em PBS. Após terem sido secas, solução de glicerina tamponada foi adicionada sobre as lâminas e foi colocada uma lamínula sobre cada lâmina. As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência, aumento de 1000x.

3.4- Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*

Para detecção de anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi,* foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, segundo SOARES et al. (1999b). Resumidamente o procedimento adotado foi o seguinte: para a sensibilização das microplacas de poliestireno, com 96 orifícios, foi utilizado antígeno de *B. burgdorferi* cepa G39/40, diluído a 15 µg/ml, em tampão carbonato pH 9,6. As placas foram incubadas em câmara úmida a 4 °C, por aproximadamente 14 horas.

Após sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 a 0,05% pH 7,4 (PBS T 20), e bloqueadas com PBS T 20 - leite desnatado a 5%, por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Ao final do bloqueio realizaram-se novas lavagens das placas, como descrito anteriormente.

Todos os soros, incluindo os controles positivos e negativos, foram diluídos a 1:400 em PBS T 20, em duplicata. Após a adição dos soros, as placas foram novamente incubadas e lavadas. Em seguida, foi adicionado conjugado anti IgG de cão ligado à fosfatase alcalina, na diluição de 1:1000 em PBS T 20, com posterior incubação e lavagem. Em todas as fases descritas, foram utilizados 200 µl de solução por orifício.

A revelação das reações foi feita com a adição de solução reveladora, constituída de para-nitro-fenil-fosfato de sódio, diluída, em tampão glicina pH 10,5, na concentração de 1mg/ml, em temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro, para microplacas de 96 orifícios (Microplate Reader model 450, Bio-Rad Laboratories), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm. A linha de corte do ensaio foi estabelecida pela média aritmética dos valores de densidade óptica dos soros-controle negativos mais três vezes o desvio padrão.

3.5- Coleta e Identificação dos Carrapatos

Todos os cães foram examinados, especialmente nas orelhas e coxins plantares e palmares, para detecção da presença de carrapatos. Os exemplares encontrados foram coletados e processados da seguinte forma:

- os estágios imaturos ingurgitados foram colocados em estufa incubadora para B.O.D (27 °C e 80% de umidade relativa), para que pudessem continuar o seu desenvolvimento, já que a identificação é feita mais facilmente a partir das formas adultas.

- os adultos colhidos, assim como os obtidos a partir dos estágios imaturos, foram conservados em álcool 70% e classificados segundo chave de ARAGÃO & FONSECA (1961a).

3.6- Análise estatística

O estudo das associações entre as variáveis de interesse foi realizado através do teste de GOODMAN (1964, 1965), para contrastes entre e dentro das proporções multinomiais.

4. RESULTADOS

4.1- Coleta e processamento do material

Neste estudo, foram visitadas 63 propriedades, e examinados 250 cães em sete municípios do Estado do Rio de Janeiro, sendo 26 cães, em Seropédica; 82, em Itaguaí; 41, em Paracambi; e 26, em Mangaratiba, perfazendo um total de 175 cães na Mesorregião Metropolitana; 32, em Barra do Piraí e 32, em Piraí, com um total de 64 animais na Mesorregião do Médio Paraíba, e 11, em Miguel Pereira da Mesorregião Centro-Sul Fluminense. As coletas foram realizadas de janeiro de 1997 a junho de 1998, e o número de animais examinados variou de um a 12 cães por propriedade, com média de aproximadamente quatro animais. As propriedades visitadas apresentaram características diversas, sendo algumas residências muito precárias, de "pau-a-pique" (figura 1), e outras, bem construídas, de alvenaria. Todas se situavam próximas às matas secundárias (figura 2). Apesar de não terem sido feitos exames físicos, nos cães, observou-se desde animais com bom estado geral de saúde até outros muito debilitados. A alimentação variou de ração comercial a comida caseira.

25101
U.F.R.R.J. BIBLIOTECA CENTRAL
N.º REGISTRO 73201



Figura 1- Algumas características de residências visitada para exame de cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro.



Figura 2- Propriedade, próxima à mata secundária, visitada durante a coleta e exame de material de cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro.

A grande maioria dos animais adentrava as matas para caçar, havendo inclusive muitos animais de raças especializadas em caça, como Daschund e um grupo chamado de "Americano", cujos animais apresentavam um padrão bem definido de porte, pelagem e características gerais.

Os animais foram separados em quatro faixas etárias, sendo: animais com menos de 6 meses de idade, animais com idade variando de 6 meses a 2 anos de idade, animais com idade de 2 a 5 anos e cães com idade superior a 5 anos. Não houve diferença significativa entre a distribuição das diferentes faixas etárias por município estudado (Tabela 1). Por outro lado, em Itaguaí, Paracambi, Barra do Piraí, e Piraí houve predominância de cães com idade entre 6 meses a 5 anos, enquanto que, em Miguel Pereira, o predomínio foi de cães entre 2 a 5 anos. Em Mangaratiba, foram examinados animais de todas as faixas etárias, sem diferença estatística entre as mesmas.

A distribuição das faixas etárias, entre as mesorregiões (Tabela 2), não variou significativamente. Contudo, houve maior freqüência de cães, com idades entre 6 meses e 5 anos, nas Mesorregiões Metropolitana e do Médio Paraíba, enquanto que, na Mesorregião Centro-Sul Fluminense, predominaram animais de 2 a 5 anos de idade.

Tabela 1- Distribuição das faixas etárias de cães examinados em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

Município	Faixa etária				
	< de 6 meses	De 6 m. a 2 anos	De 2 a 5 anos	> de 5 anos	Total
Seropédica	0,115 $^{a\,A}$	0,346 $^{a\,A}$	0,269 $^{a\,A}$	0,269 $^{a\,A}$	26
Itaguaí	0,122 $^{a\,A}$	0,354 $^{a\,B}$	0,280 $^{a\,B}$	0,244 $^{a\,AB}$	82
Paracambi	0,146 $^{a\,A}$	0,390 $^{a\,B}$	0,390 $^{a\,B}$	0,073 $^{a\,A}$	41
Mangaratiba	0,115 $^{a\,A}$	0,385 $^{a\,A}$	0,346 $^{a\,A}$	0,154 $^{a\,A}$	26
Barra do Piraí	0,063 $^{a\,A}$	0,313 $^{a\,B}$	0,531 $^{a\,B}$	0,094 $^{a\,A}$	32
Piraí	0,125 $^{a\,A}$	0,500 $^{a\,B}$	0,281 $^{a\,AB}$	0,094 $^{a\,A}$	32
Miguel Pereira	0,091 $^{a\,A}$	0,182 $^{a\,A}$	0,545 $^{a\,B}$	0,182 $^{a\,A}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 2- Distribuição das faixas etárias de cães examinados em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

Mesorregião	Faixa etária				
	< de 6 meses	De 6 m. a 2 anos	De 2 a 5 anos	> de 5 anos	Total
Mesorregião Metropolitana	0,126 $^{a\ A}$	0,366 $^{a\ B}$	0,314 $^{a\ B}$	0,194 $^{a\ A}$	175
Mesorregião do Médio Paraíba	0,094 $^{a\ A}$	0,406 $^{a\ B}$	0,406 $^{a\ B}$	0,094 $^{a\ A}$	64
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	0,091 $^{a\ A}$	0,182 $^{a\ AB}$	0,545 $^{a\ B}$	0,182 $^{a\ AB}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

4.2- Hemoparasitos

O índice de positividade, para hemoparasitos, foi alto em todos os municípios pesquisados, variando de 11,5% em Mangaratiba a 71,8% em Piraí (Tabela 3). Mangaratiba foi o município onde se observou a menor prevalência de hemoparasitos, apesar de possuir características fisiográficas semelhantes às outras regiões estudadas.

Em relação às mesorregiões, a Mesorregião do Médio Paraíba foi a que apresentou maior índice de positividade, 62,5% (Tabela 4).

4.3- *Babesia canis*

4.3.1- Diagnóstico parasitológico

Babesia canis (figura 3) foi pouco freqüente, no diagnóstico parasitológico, por esfregaço sangüíneo, tendo sido encontrada em somente 5,2% dos cães examinados (Tabela 5). Em quatro animais, encontrou-se associação de *B. canis* com *H. canis*. Não houve diferença estatística na ocorrência desse protozoário entre os diferentes municípios (Tabela 5) e entre as mesorregiões (Tabela 6), sendo o índice de positividade baixo em todos eles. Também não houve diferença estatística, na positividade, entre as faixas etárias (Tabela 7).

Tabela 3- Número de animais positivos para *Hepatozoon canis* (H.c), *Babesia canis* (B.c) e *Ehrlichia canis* (E.c), diagnosticados pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães de áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

	Seropédica	Itaguaí	Paracambi	Mangaratiba	Barra do Piraí	Piraí	MiguelPereira
Parasito	26*	82*	41*	26*	32*	32*	11*
H.c	4	32	16	3	16	16	1
E.c	1	3	1	-	-	1	-
B.c	1	2	-	-	-	3	3
H.c+E.c	-	5	-	-	-	1	-
H.c+B.c	-	1	-	-	1	2	-
Total	6	43	17	3	17	23	4

* número total de animais examinados em cada município

Tabela 4- Número de animais positivos para *Hepatozoon canis* (H.c), *Babesia canis* (B.c) e *Ehrlichia canis* (E.c), diagnosticados pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães de áreas rurais três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

Parasito	Mesorregião Metropolitana 175*	Mesorregião do Médio Paraíba 64*	Mesorregião Centro-Sul Fluminense 11*
H.c.	55	32	1
E.c.	5	1	-
B.c.	3	3	3
H.c. + E.c.	5	1	-
H.c. + B.c.	1	3	-
Total	69	40	4

* número total de animais examinados em cada mesorregião

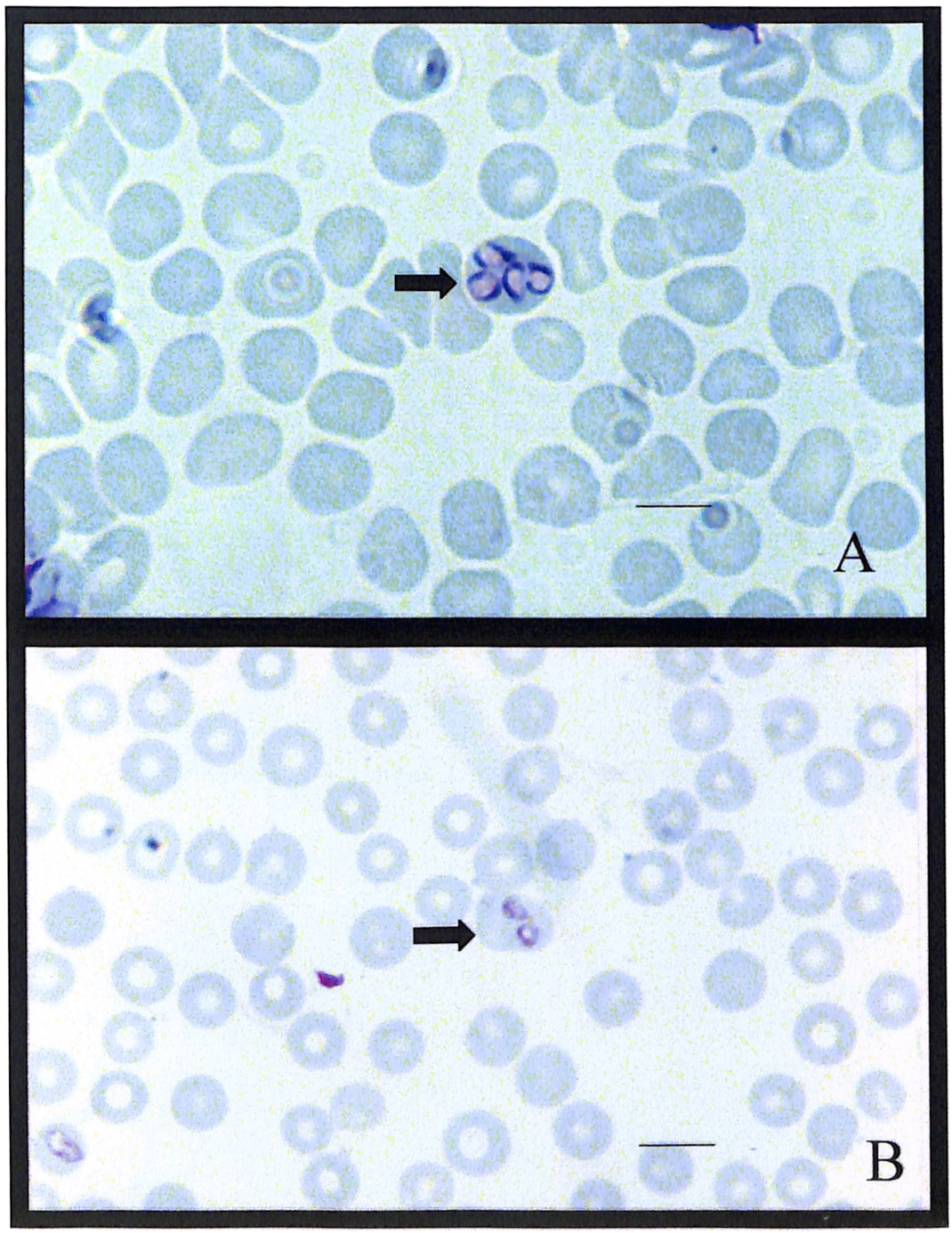

Figura 3A e 3B- *Babesia canis* diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em eritrócitos de cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro. (— = 10µm)

Tabela 5- Ocorrência de *Babesia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

	Babesia canis		
Município	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	0,962 ^{aB}	0,038 ^{aA}	26
Itaguaí	0,963 ^{aB}	0,037 ^{aA}	82
Paracambi	1,000 ^{aB}	0,000 ^{aA}	41
Mangaratiba	1,000 ^{aB}	0,000 ^{aA}	26
Barra do Piraí	0,969 ^{aB}	0,031 ^{aA}	32
Piraí	0,844 ^{aB}	0,156 ^{aA}	32
Miguel Pereira	0,727 ^{aB}	0,273 ^{aA}	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 6- Ocorrência de *Babesia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

Mesorregião	*Babesia canis*		
	Negativo	Positivo	Total
Mesorregião Metropolitana	0,997 $^{a\,A}$	0,023 $^{a\,B}$	175
Mesorregião do Médio Paraíba	0,906 $^{a\,A}$	0,094 $^{a\,B}$	64
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	0,727 $^{a\,A}$	0,273 $^{a\,B}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 7- Ocorrência de *Babesia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sangüíneo, segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	Babesia canis		
Faixa etária	Negativo	Positivo	Total
< de 6 meses	0,931 ^{aB}	0,069 ^{aA}	29
6 meses a 2 anos	0,935 ^{aB}	0,065 ^{aA}	92
De 2 a 5 anos	0,954 ^{aB}	0,046 ^{aA}	87
> de 5 anos	0,976 ^{aB}	0,024 ^{aA}	42

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

4.3.2- Diagnóstico sorológico de anticorpos anti- *Babesia canis* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI).

Foram examinados soros de 205 animais, e, destes, 85 (41,1%) apresentaram anticorpos anti- *B. canis* à IFI (figura 4), com títulos ≥ 1:40. Três animais (3,5%) apresentaram título de 1:40; 19 (22,3%), título de 1:80; e 63 (74,1%), título ≥ 1:160. A distribuição dos animais examinados, por município, encontra-se na Tabela 8. Mangaratiba (63,6%), Seropédica (62,5%) e Piraí (56,7%) foram as regiões com maior índice de positividade, sendo a diferença, com as demais regiões, significativa estatisticamente. Itaguaí também apresentou uma positividade elevada (39,1%). Em Paracambi, Barra do Piraí e Miguel Pereira, o percentual de animais negativos e positivos diferiu significativamente, ficando a positividade em torno de 20%. Contudo, quando se analisou a presença de anticorpos anti-*B. canis*, entre as três mesorregiões, não houve diferença significativa entre elas (Tabela 9). Nas mesorregiões Metropolitana e do Médio Paraíba, o percentual de animais positivos se equivaleu ao de animais negativos.

A relação entre positividade, na IFI, para *B. canis*, e a faixa etária dos animais examinados, encontra-se na Tabela 10. Não houve diferença significativa entre a positividade, na IFI, para *B. canis*, e a idade dos animais até os 5 anos de idade. Entretanto, a partir dos 5 anos, a prevalência subiu para 63,8%, sendo estatisticamente superior às demais. No presente estudo, três cães, com parasitemia para *B. canis*, não apresentaram anticorpos, anti- *B. canis*, no teste de IFI.

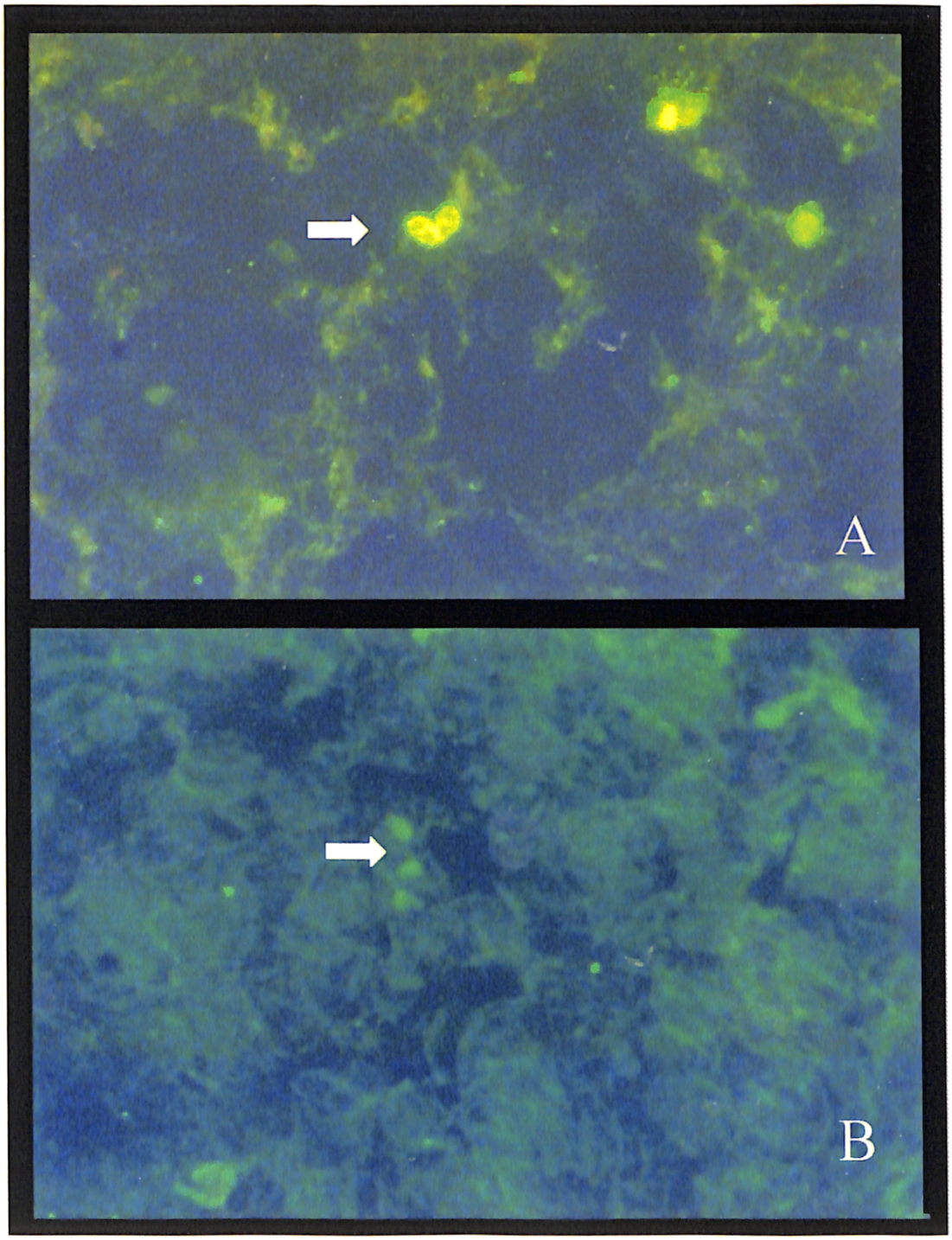

Figura 4- Reação de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis* em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro:
Fig. A- Reação positiva/ Fig. B- Reação negativa

Tabela 8- Ocorrência de anticorpos anti-*Babesia canis,* diagnosticados, pelo método de imunofluorescência indireta (IFI), em soro de cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

	IFI para *Babesia canis*		
Município	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	0,375 $^{a\,A}$	0,625 $^{b\,A}$	16
Itaguaí	0,609 $^{a,b\,A}$	0,391 $^{a,b\,A}$	74
Paracambi	0,778 $^{b\,B}$	0,222 $^{a\,A}$	27
Mangaratiba	0,364 $^{a\,A}$	0,636 $^{b\,A}$	22
Barra do Piraí	0,731 $^{b\,B}$	0,269 $^{a\,A}$	26
Piraí	0,433 $^{a\,A}$	0,567 $^{b\,A}$	30
Miguel Pereira	0,800 $^{b\,B}$	0,200 $^{a\,A}$	10

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 9- Ocorrência de anticorpos anti-*Babesia canis,* diagnosticados, pelo método de imunofluorescência indireta (IFI), em soro de cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

Mesorregião	IFI para *Babesia canis*		
	Negativo	Positivo	Total
Mesorregião Metropolitana	0,576 [a A]	0,424 [a B]	139
Mesorregião do Médio Paraíba	0,571 [a A]	0,429 [a A]	56
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	0,800 [a A]	0,200 [a B]	10

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 10- Ocorrência de anticorpos anti- *Babesia canis,* diagnosticados, pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	IFI para *Babesia canis*		
Faixa etária	Negativo	Positivo	Total
< de 6 meses	0,636 $^{b\,B}$	0,364 $^{a\,A}$	11
De 6 meses a 2 anos	0,613 $^{b\,B}$	0,387 $^{a\,A}$	80
De 2 a 5 anos	0,654 $^{b\,B}$	0,346 $^{a\,A}$	78
> de 5 anos	0,363 $^{a\,A}$	0,638 $^{b\,B}$	36

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

4.4- *Hepatozoon canis*

Hepatozoon canis (figura 5) foi o hemoparasito diagnosticado com maior freqüência, tendo sido encontrado em 39,2 % dos cães examinados (Tabela 11). Analisando a ocorrência de *H. canis*, entre os municípios estudados, pôde-se observar que os municípios de Itaguaí, Barra do Piraí e Piraí, que apresentaram respectivamente 46,3%, 53,0% e 59,4% de positividade, diferiram estatisticamente dos demais. Além disso, quando se analisou o percentual de positividade em cada município, notamos equivalência entre o número de animais positivos e o número de animais negativos, nas regiões de Itaguaí, Paracambi, Barra do Piraí e Piraí.

Quando se analisou a ocorrência de *H. canis,* entre as mesorregiões (tabela 12), houve diferença significativa nas prevalências entre as três mesorregiões, sendo que a Mesorregião do Médio Paraíba foi a que apresentou maior prevalência (56,3%), enquanto a Mesorregião Centro-Sul Fluminense apresentou prevalência de 9,1%.

A distribuição da infecção por *H. canis*, em relação à faixa etária (tabela 13), foi equivalente entre as quatro faixas etárias estabelecidas, contudo, nos animais menores de 6 meses de idade e naqueles com idade variando de 2 a 5 anos de idade, houve diferença significativa entre o percentual de positivos e negativos, com índices de positividade inferiores aos de negatividade.

Apesar da alta prevalência de *H. canis*, a parasitemia foi muito baixa, variando de menos de 0,5% a 3% dos neutrófilos/monócitos circulantes parasitados, sendo que 56% dos animais possuíam parasitemia inferior a 0,5%.

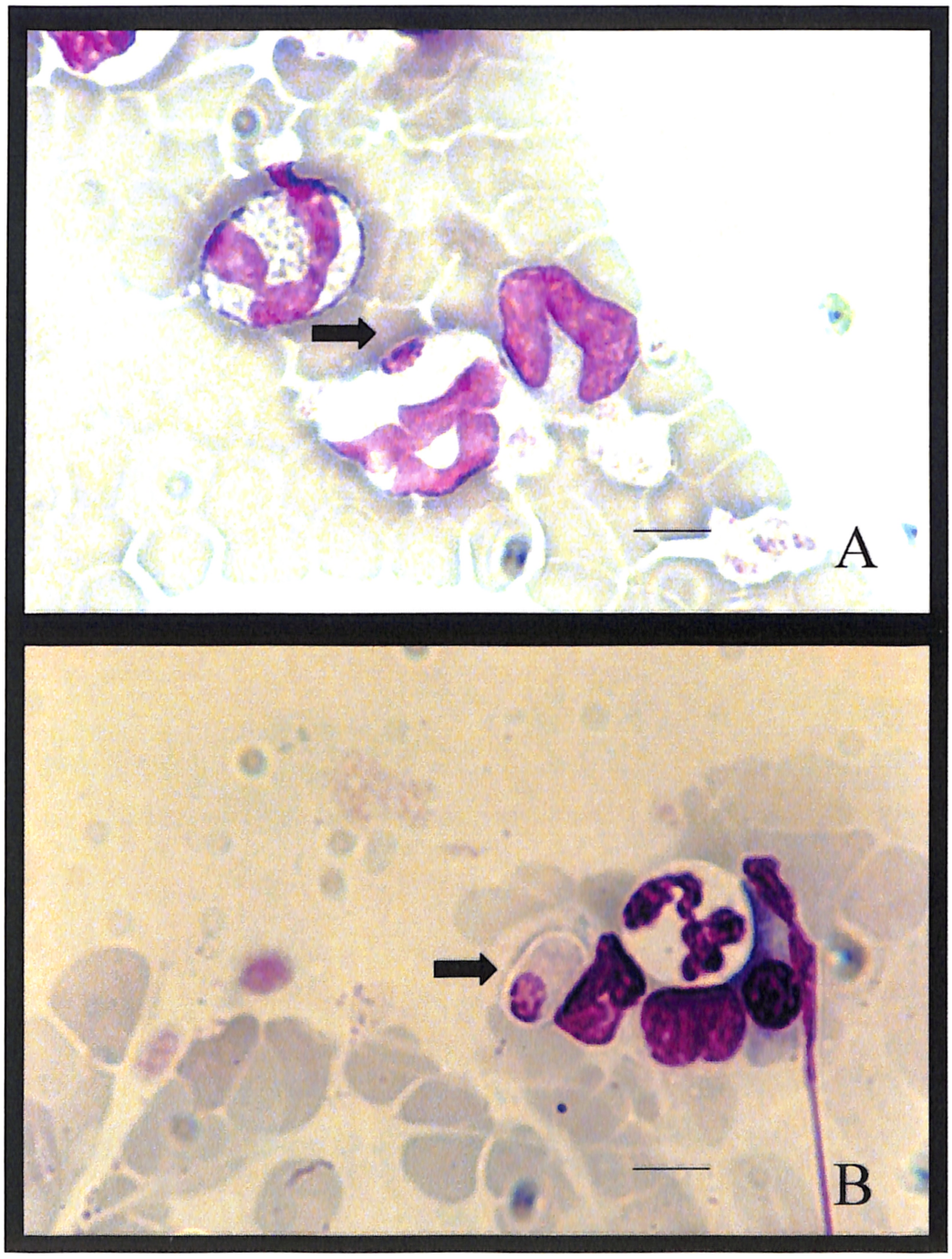

Figura 5- Gametócitos de *Hepatozoon canis*, diagnosticados, pelo método de esfregaço sangüíneo, observados em polimorfonucleares de cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro. (— = 10 μm)
Fig. A- vista lateral/ Fig. B- vista dorsal.

Tabela 11- Ocorrência de *Hepatozoon canis,* diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

	Hepatozoon canis		
Município	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	0,846 $^{b\,B}$	0,154 $^{a\,A}$	26
Itaguaí	0,537 $^{a\,A}$	0,463 $^{b\,A}$	82
Paracambi	0,610 $^{a,b\,A}$	0,390 $^{a,b\,A}$	41
Mangaratiba	0,885 $^{b\,B}$	0,115 $^{a\,A}$	26
Barra do Piraí	0,469 $^{a\,A}$	0,531 $^{b\,A}$	32
Piraí	0,406 $^{a\,A}$	0,594 $^{b\,A}$	32
Miguel Pereira	0,909 $^{b\,B}$	0,091 $^{a\,A}$	11

Letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 12- Ocorrência de *Hepatozoon canis,* diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

	Hepatozoon canis		
Mesorregião	Negativo	Positivo	Total
Mesorregião Metropolitana	0,651 $^{a A}$	0,349 $^{a B}$	175
Mesorregião do Médio Paraíba	0,438 $^{b A}$	0,563 $^{b B}$	64
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	0,909 $^{c A}$	0,091 $^{c B}$	11

Letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 13- Ocorrência de *Hepatozoon canis*, diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	Hepatozoon canis		
Faixa etária	Negativo	Positivo	Total
< 6 meses	0,690 ^{aB}	0,310 ^{aA}	29
6 m a 2 anos	0,576 ^{aA}	0,424 ^{aA}	92
2 a 5 anos	0,644 ^{aB}	0,356 ^{aA}	87
> 5 anos	0,548 ^{aA}	0,452 ^{aA}	42

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

4.5- *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis (figura 6) foi diagnosticada em 4,8% dos cães, e também não houve diferença estatística na sua distribuição entre os municípios (Tabela 14), entre as mesorregiões (Tabela 15) e entre as faixas etárias (Tabela 16). Seis cães apresentaram associação entre *E. canis* e *H. canis*, sendo que em um dos cães foi encontrado um monócito parasitado com ambos parasitos.

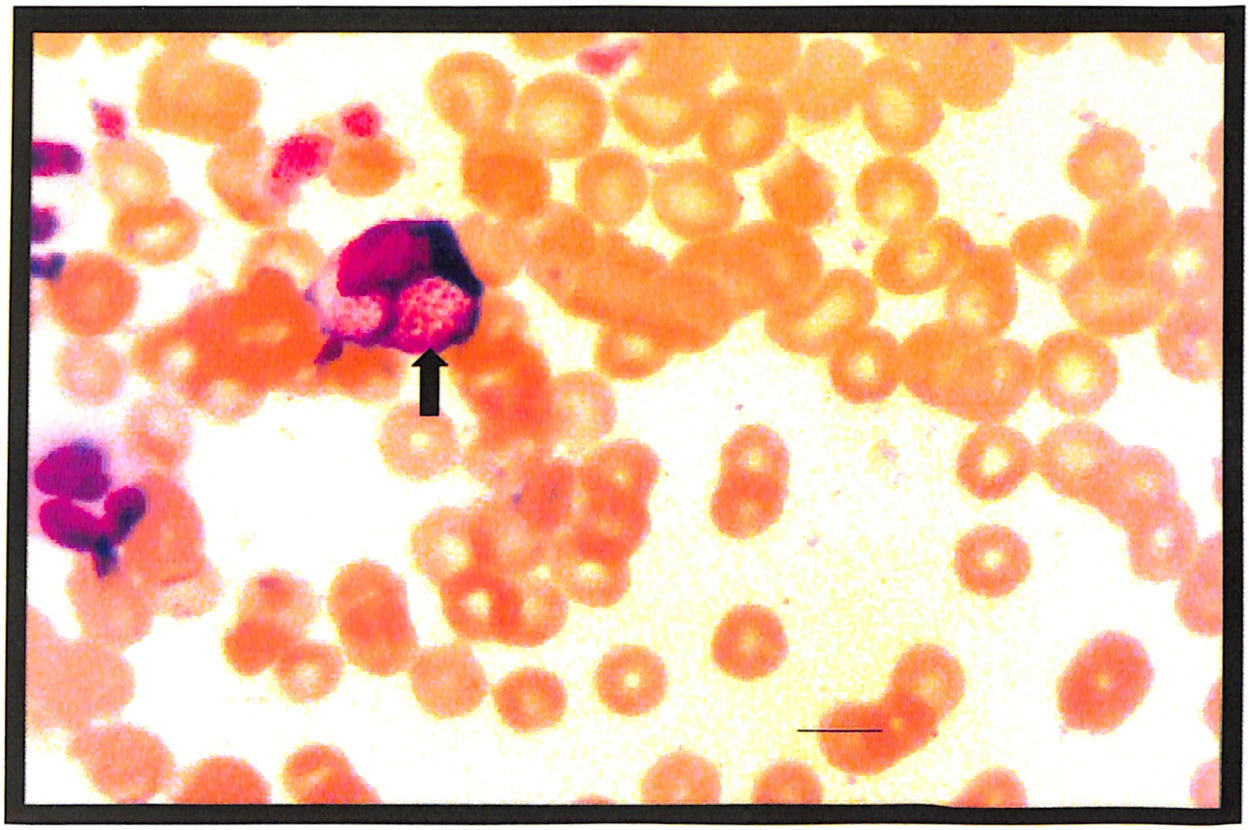

Figura 6- Mórula de *Ehrlichia canis*, diagnosticada pelo método de esfregaço sangüíneo, em mononuclear de cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro (— = 10 µm).

Tabela 14- Ocorrência de *Ehrlichia canis*, diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

	Ehrlichia canis		
Município	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	0,962 ^{aB}	0,038 ^{aA}	26
Itaguaí	0,902 ^{aB}	0,098 ^{aA}	82
Paracambi	0,976 ^{aB}	0,024 ^{aA}	41
Mangaratiba	1,000 ^{aB}	0,000 ^{aA}	26
Barra do Piraí	1,000 ^{aB}	0,000 ^{aA}	32
Piraí	0,938 ^{aB}	0,063 ^{aA}	32
Miguel Pereira	1,000 ^{aB}	0,000 ^{aA}	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 15- Ocorrência de *Ehrlichia canis,* diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

	Ehrlichia canis		
Mesorregião	Negativo	Positivo	Total
Mesorregião Metropolitana	0,943 $^{a A}$	0,057 $^{a B}$	175
Mesorregião do Médio Paraíba	0,969 $^{a A}$	0,031 $^{a B}$	64
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	1,000 $^{a A}$	0,000 $^{a B}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 16- Distribuição de *Ehrlichia canis,* diagnosticada, pelo método de esfregaço sangüíneo, em relação à faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	Ehrlichia canis		
Faixa etária	Negativo	Positivo	Total
< de 6 meses	0,931 ^{aB}	0,069 ^{aA}	29
De 6 meses a 2 anos	0,967 ^{aB}	0,033 ^{aA}	92
De 2 a 5 anos	0,989 ^{aB}	0,011 ^{aA}	87
> de 5 anos	0,857 ^{aB}	0,143 ^{aA}	42

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

4.6- Diagnóstico sorológico de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi lato sensu* pelo método de ELISA indireto.

Soros de 199 cães foram utilizados na pesquisa de anticorpos da classe IgG contra *B. burgdorferi lato sensu* (figura 7). Destes, 15,58% foram positivos, com títulos de 1:400 (13,57% dos cães), 1:800 (1,51%) e 1: 1600 (0,5%). A distribuição dos casos positivos, segundo a região, encontra-se na Tabela 17.

De acordo com a Tabela 17, apesar das regiões de Miguel Pereira (30,0%), Piraí (21,4%) e Itaguaí (21,1%) terem apresentado as maiores prevalências, não houve diferença estatística entre os municípios pesquisados. Em Miguel Pereira, o percentual de casos positivos e negativos foi equivalente. A ocorrência de anticorpos anti- *B. burgdorferi* não diferiu estatisticamente em relação às mesorregiões (Tabela 18).

A distribuição de casos positivos de *B. burgdorferi,* segundo a faixa etária, pode ser observada na Tabela 19. Os casos positivos distribuíram-se equivalentemente entre as faixas etárias maiores de 6 meses de idade. Na Tabela 19, é possível observar-se que não houve casos de sorologia positiva em cães com menos de 6 meses de idade. No entanto, a partir dos 6 meses, todas as faixas etárias foram igualmente acometidas, sem diferença estatística entre elas. Apesar de não ser estatisticamente significativo, cães com idade superior a 5 anos foram os que tiveram maior percentual de positividade (26,5%).

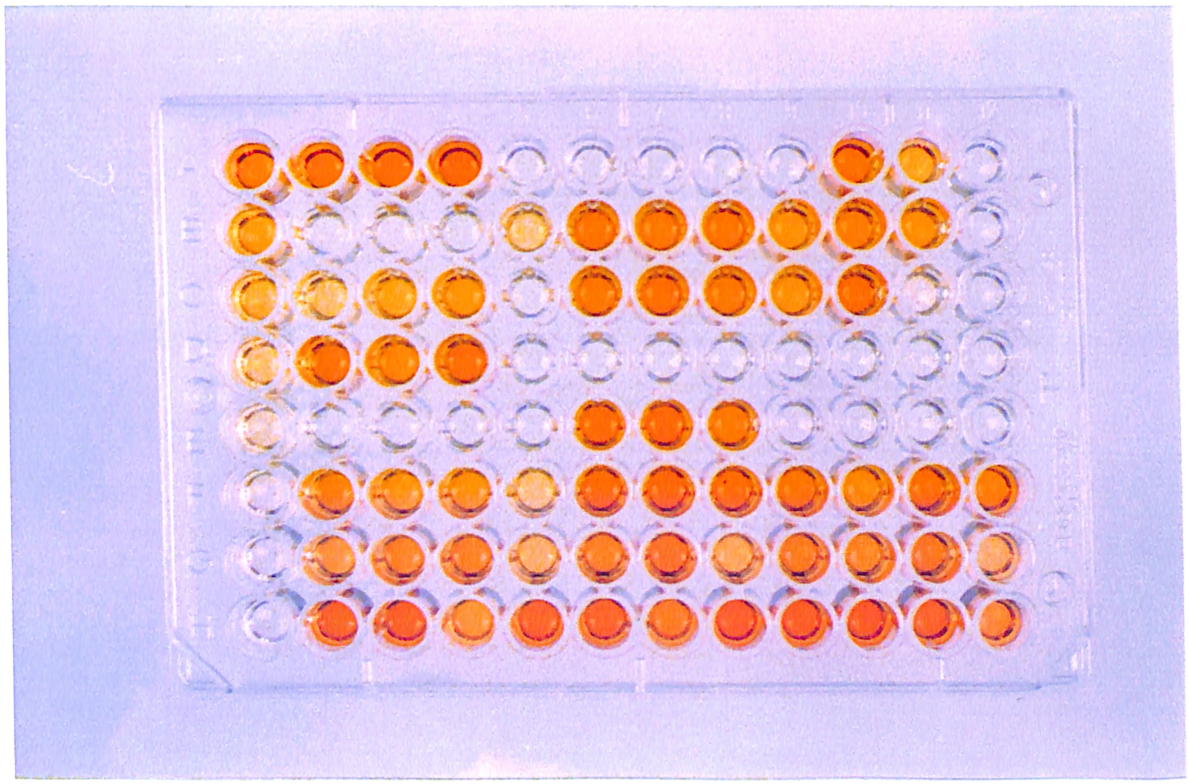

Figura 7- Pesquisa de anticorpos da classe IgG anti- *Borrelia burgdorferi lato sensu*, pelo método de ELISA indireto, em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 17- Ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu,* diagnosticados, pelo método de ELISA indireto, em soro de cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

Município	Anticorpos anti- *B. burgdorferi*		
	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	0,867 $^{a B}$	0,133 $^{a A}$	15
Itaguaí	0,789 $^{a B}$	0,211 $^{a A}$	71
Paracambi	0,929 $^{a B}$	0,071 $^{a A}$	28
Mangaratiba	0,955 $^{a B}$	0,045 $^{a A}$	22
Barra do Piraí	0,920 $^{a B}$	0,080 $^{a A}$	25
Piraí	0,786 $^{a B}$	0,214 $^{a A}$	28
Miguel Pereira	0,700 $^{a A}$	0,300 $^{a A}$	10

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 18- Ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu,* diagnosticados, pelo método de ELISA indireto, em soro de cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

	ELISA para *B. burgdorferi*		
Mesorregião	Negativo	Positivo	Total
Mesorregião Metropolitana	0,853 $^{a\,A}$	0,147 $^{a\,B}$	136
Mesorregião do Médio Paraíba	0,849 $^{a\,A}$	0,151 $^{a\,B}$	53
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	0,700 $^{a\,A}$	0,300 $^{a\,A}$	10

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 19- Distribuição de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi latu sensu,* diagnosticados, pelo método de ELISA indireto, segundo a faixa etária de cães examinados, em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	Anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*		
Faixa etária	Negativo	Positivo	Total
< de 6 meses	1,000 ^{bB}	0,000 ^{aA}	11
De 6 meses a 2 anos	0,872 ^{aB}	0,128 ^{bA}	78
De 2 a 5 anos	0,842 ^{aB}	0,158 ^{bA}	76
> de 5 anos	0,735 ^{aB}	0,265 ^{bA}	34

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

4.7- Carrapatos

Carrapatos foram retirados em 94 (37,6%) dos cães examinados, sendo que 23,6% estavam infestados por *A. cajennense*, 12,4% por *R. sanguineus*, 2,8% por *A. aureolatum* e 2% por *A. ovale* (figuras 8 e 9). Alguns animais apresentaram mais de uma espécie de carrapato, assim, em Itaguaí, cinco cães estavam parasitados por *A. cajennense* e *R. sanguineus*, em Barra do Piraí, um apresentou *A. cajennense* e *A. aureolatum* e, em Itaguaí, dois apresentaram *A. cajennense* e *A. ovale*.

Rhipicephalus sanguineus foi encontrado em todas as regiões, com exceção de Paracambi (Tabela 20). As regiões com maior prevalência foram Mangaratiba (15,5%), Itaguaí (15,9%) e Miguel Pereira (45,5%), diferindo estatisticamente das demais regiões. Na região de Miguel Pereira, não houve diferença significativa entre o número de positivos e negativos. Quando se analisou a presença de *R. sanguineus*, entre as mesorregiões, não houve diferença estatística entre elas (Tabela 21).

Amblyomma cajennense foi encontrado, parasitando cães, nas regiões de Itaguaí, Paracambi, Barra do Piraí, Piraí e Miguel Pereira (Tabela 22). As regiões de Itaguaí e Paracambi apresentaram as maiores ocorrências, 42,7% e 39,0%, respectivamente, diferindo das demais regiões. Nessas duas regiões, não houve diferença estatística entre o percentual de animais que estavam parasitados com *A. cajennense* e os animais que não estavam parasitados. A espécie *A. aureolatum* foi diagnosticada somente em Barra do Piraí, enquanto *A. ovale* foi observado somente em Itaguaí.

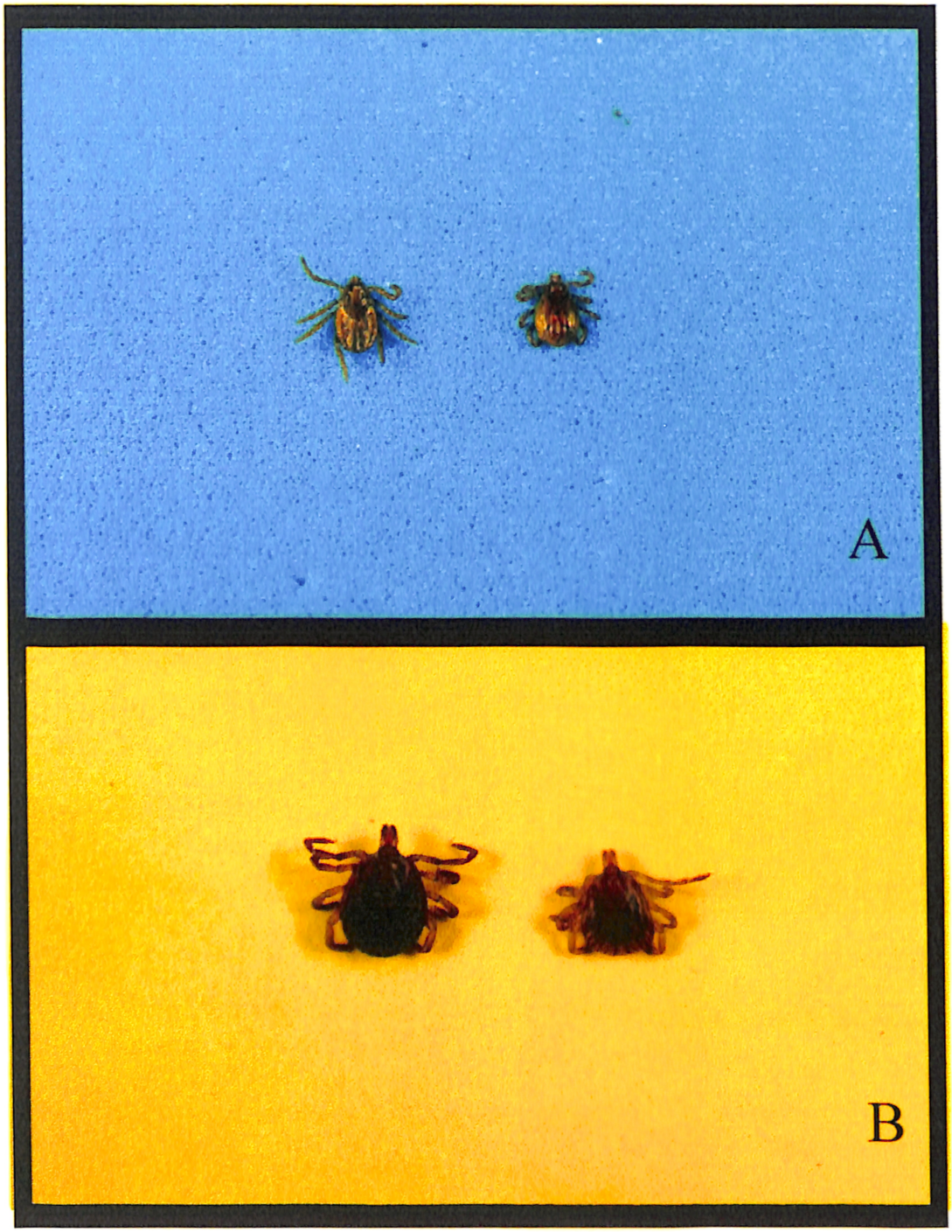

Figura 8- Carrapatos encontrados em cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro: Fig. 8A- *Rhipicephalus sanguineus*, fêmea e macho/ Fig. 8B- *Amblyomma cajennense*, fêmea e macho.

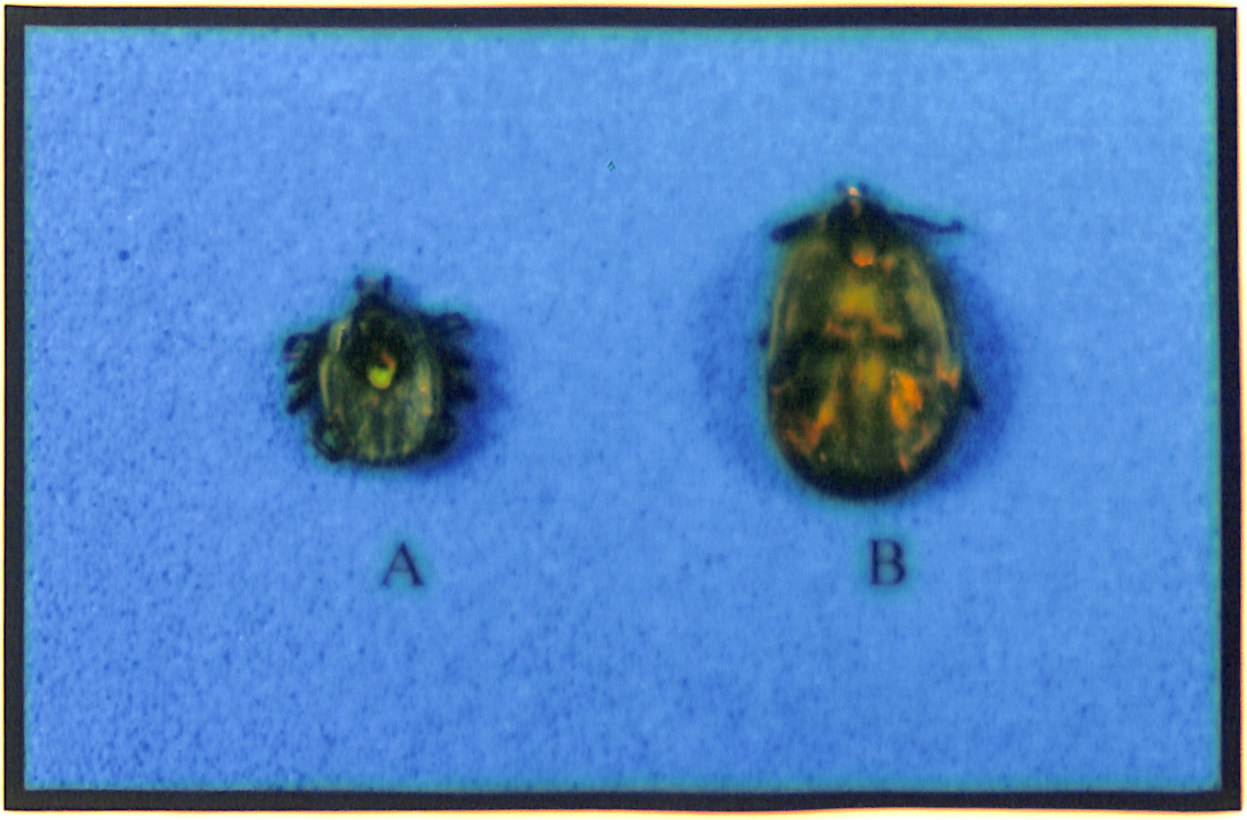

Figura 9- Carrapatos encontrados em cães procedentes de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro:
Fig. 9A- *Amblyomma* ovale, fêmea
Fig. 9B- *Amblyomma aureolatum*, fêmea

Tabela 20- Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães examinados, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro

	Rhipicephalus sanguineus		
Municípios	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	0,885 $^{a,b\ B}$	0,115 $^{a,b\ A}$	26
Itaguaí	0,841 $^{a\ B}$	0,159 $^{b\ A}$	82
Paracambi	1,000 $^{b\ B}$	0,000 $^{a\ A}$	41
Mangaratiba	0,846 $^{a\ B}$	0,154 $^{b\ A}$	26
Barra do Piraí	0,938 $^{a,b\ B}$	0,063 $^{a,b\ A}$	32
Piraí	0,875 $^{a,b\ B}$	0,125 $^{a,b\ A}$	32
Miguel Pereira	0,545 $^{a\ A}$	0,455 $^{b\ A}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Tabela 22- Ocorrência *de Amblyomma cajennense* coletados em cães examinados, em áreas rurais de sete Municípios do Estado do Rio de Janeiro

Município	*Amblyomma cajennese*		
	Negativo	Positivo	Total
Seropédica	1,000 $^{b\,B}$	0,000 $^{a\,A}$	26
Itaguaí	0,573 $^{a\,A}$	0,427 $^{b\,A}$	82
Paracambi	0,610 $^{a\,A}$	0,390 $^{b\,A}$	41
Mangaratiba	1,000 $^{b\,B}$	0,000 $^{a\,A}$	26
Barra do Piraí	0,969 $^{b\,B}$	0,031 $^{a\,A}$	32
Piraí	0,844 $^{b\,B}$	0,156 $^{a\,A}$	32
Miguel Pereira	0,818 $^{a,b\,B}$	0,182 $^{a,b\,A}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

Em relação aos estágios recuperados, no caso de *R. sanguineus*, *A. aureolatum* e *A. ovale*, somente adultos foram encontrados sobre os animais, e as infestações foram baixas. Já em relação a *A. cajennense,* foram recuperados sobre os animais preponderantemente ninfas e larvas, em grandes quantidades, fixadas principalmente nas orelhas dos animais. Quando se analisou a presença de *A. cajennense* entre as mesorregiões (Tabela 23), a Mesorregião Metropolitana apresentou a maior prevalência (29,1%),diferindo estatisticamente das demais.

Ao correlacionar-se a presença de *A. cajennense* com a presença de *H. canis* (Tabela 24), pôde-se notar que a prevalência de *H. canis* foi maior quando havia carrapatos *A. cajennense* (31,6%) do que quando estes não estavam presentes (18,4%), sendo essa diferença estatisticamente significativa.

Carrapatos *A. cajennense* foram observados em 38,7% dos cães com anticorpos contra *B. burgdorferi* (Tabela 25), apesar disso, não houve diferença estatística com o grupo de animais positivos que não apresentou carrapatos (21,4%).

Tabela 23- Ocorrência *de Amblyomma cajennense* coletados em cães examinados, em áreas rurais de três Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro

	Amblyomma cajennense		
Mesorregião	Negativo	Positivo	Total
Mesorregião Metropolitana	0,709 $^{a\,A}$	0,291 $^{a\,B}$	175
Mesorregião do Médio Paraíba	0,906 $^{b\,A}$	0,094 $^{b\,B}$	64
Mesorregião Centro-Sul Fluminense	0,818 $^{a\,b\,A}$	0,182 $^{a\,b\,B}$	11

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$)

Tabela 24- Relação entre a ocorrência de *Hepatozoon canis,* diagnosticado, pelo método de esfregaço sangüíneo, e a presença de *Amblyomma cajennense* coletados em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	Hepatozoon canis		
Amblyomma Cajennense	Negativo	Positivo	Total
Negativo	0,816 ^{bB}	0,184 ^{aA}	152
Positivo	0,684 ^{aB}	0,316 ^{bA}	98

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$)

Tabela 25- Relação entre a ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu,* diagnosticados pelo método de ELISA indireto, e a presença de *Amblyomma cajennense,* em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro

	Borrelia burgdorferi		
Amblyomma cajennense	Negativo	Positivo	Total
Negativo	0,786 $^{a\,B}$	0,214 $^{a\,A}$	168
Positivo	0,613 $^{a\,A}$	0,387 $^{a\,A}$	31

Letras minúsculas diferentes, nas colunas, e letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença estatística significativa ($P< 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1- Coleta e processamento do material

Ao serem visitadas propriedades, em áreas rurais de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro, observou-se que, nessas áreas, os cães são importantes no dia-a-dia das pessoas, acompanhando seus proprietários na lida do campo. Foram poucas as propriedades com menos de quatro cães, sendo que, em algumas, foram encontrados até 12 animais. A proximidade com a mata favoreceu que esses animais caçassem, e, muitas vezes, permanecessem nas matas por dias. Muitas das propriedades visitadas eram rústicas, e os animais não recebiam nenhum tipo de cuidado veterinário. Entretanto, em outras propriedades, os cães eram freqüentemente tratados, principalmente, com ectoparasiticidas. Essas diferenças podem explicar, em parte, que, em algumas regiões, o índice de positividade, para hemoparasitos, tenha sido inferior ao de outras, como, por exemplo, Mangaratiba, em relação à Piraí. Mesmo tendo características semelhantes, como a proximidade com matas, as regiões apresentam ecossistemas distintos, que também contribuem para a maior ou menor ocorrência de determinado parasito naquela região. De qualquer forma, nas áreas rurais, a falta de atendimento é um fato, seja para o homem, seja

para animais, e, se os animais são mais expostos a doenças, a saúde do homem também pode ser exposta.

5.2- Hemoparasitos

O método de diagnóstico por esfregaço sangüíneo é pouco sensível, embora específico (BREITSCHWERDT, 1993). Apesar disso, o índice de positividade geral, para hemoparasitos, foi elevado, 45,2%, atingindo 71,8%, em Piraí. Essa alta positividade, em Piraí, fez com que a Mesorregião do Médio Paraíba, apresentasse a maior prevalência (62,5%) entre as mesorregiões. Utilizando o mesmo método de diagnóstico, EZEOKOLI *et alii* (1983) encontraram 38,1% de cães infectados com hemoparasitos, na Nigéria, enquanto BANSAL *et alii* (1985) observaram somente 7,7% de positividade, em cães, na Índia, resultado inferior ao observado no presente estudo.

5.3- *Babesia canis*

5.3.1- Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico de *B. canis*, por meio de esfregaços sangüíneos, é de baixa sensibilidade, principalmente quando realizado em cães portadores assintomáticos, pois, devido à baixa parasitemia, o agente não é facilmente demonstrado no sangue (ANDERSON *et alii*, 1980; BREITSCHWERDT *et alii*, 1983; LEVY *et alii*, 1987; WLOSNIEWSK *et alii*, 1997). Dessa forma, RAJAMANICKAM *et alii* (1985) observaram

somente 1,1% de positividade. Quando são examinados animais com suspeita clínica, a prevalência aumenta, mesmo utilizando-se esse método diagnóstico, como ocorreu com MATTHEWMAN *et alii* (1993 b), que diagnosticaram 26% de animais positivos, em um Hospital Veterinário da África do Sul. A forma clínica da doença afeta principalmente cães jovens, o que foi demonstrado por FARWELL *et alii* (1982), que observaram que 64% dos cães doentes tinham menos de quatro meses de idade, e por ABDULLAHI *et alii* (1990), que verificaram que 70% de animais positivos tinham menos de um ano. Neste estudo, foi coletado material de animais independente de manifestação clínica, e isso pode explicar a baixa prevalência e a distribuição uniforme do parasito em todas as faixas etárias. Embora os animais, com idade superior a 5 anos, tenham apresentado prevalência menor, não houve diferença estatística entre as diferentes faixas etárias. PARAENSE & VIANNA (1949) obtiveram prevalência muito superior a do presente trabalho, com 14% de positividade, em cães de rua do Rio de Janeiro.

5.3.2- Diagnóstico sorológico de anticorpos anti- *Babesia canis* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI).

A prevalência observada de *B. canis* foi maior, quando se utilizou o diagnóstico sorológico (41,1%), do que quando se utilizou o diagnóstico parasitológico (5,2%). Esse resultado era esperado, pois, a parasitemia de *B. canis*, em animais portadores assintomáticos, é muito baixa para ser detectada no esfregaço sangüíneo. Por outro lado, títulos de anticorpos, obtidos pelo método de IFI, são duradouros (TODOROVIC, 1981; LEVY *et alii*, 1987; YAMANE *et alii*, 1993). Segundo VERCAMMEN *et alii* (1995), infecção crônica é acompanhada de flutuação de títulos altos, sendo a IFI um bom teste

diagnóstico. BANSAL *et alii* (1985) obtiveram resultados similares aos do presente estudo, encontrando somente 5,4% de animais positivos para *B. canis*, nos esfregaços sangüíneos, enquanto 37% eram positivos, no teste sorológico. Na Califórnia, Estados Unidos da América (EUA), a soroprevalência para *B. canis* variou até 13%, em várias regiões pesquisadas, sem que fossem detectados parasitos, nos esfregaços sangüíneos dos cães positivos (YAMANE *et alii*, 1994). BANETH *et alii* (1998a) observaram 90% de animais com anticorpos para *B. canis*, quando examinaram animais com suspeita clínica de hemoparasitose.

Apesar de alguns autores considerarem positivos, na IFI, animais com título ≥ 1:80 (TABOADA *et alii*, 1992; YAMANE *et alii*, 1993), outros autores estabeleceram títulos ≥ 1:40 como positivos (VERCAMMEN *et alii*, 1995; FARWELL *et alii*, 1982; RIBEIRO *et alii*, 1990), como o utilizado no presente estudo. Essa variação, na linha de corte, deve-se às diferenças na preparação do antígeno e padronização da técnica.

A alta prevalência geral (41,1%), encontrada no presente trabalho, foi semelhante à obtida por UILEMBERG *et alii* (1989), que observaram 40% de cães positivos, na África do Sul; KORDICK *et alii* (1999), que encontraram 59,2% de positividade, nos EUA; DELL'PORTO (1986), que verificou 42,4% de positividade, em cães da cidade de São Paulo, e BANSAL *et alii* (1985), que observaram 37% de positivos, na Índia. Nas regiões de Mangaratiba, Seropédica e Piraí, a prevalência ficou próxima à observada por RIBEIRO *et alii* (1990), que obtiveram 66,9% de cães positivos, na cidade de Belo Horizonte. Em outros países, a positividade para *B. canis* é muito baixa, mesmo quando são utilizados testes sorológicos. Assim, DEPLAZES *et alii* (1995) observaram somente 0,8% de cães

positivos na Suíça, enquanto que YAMANE *et alii* (1993) não encontraram nenhuma positividade, em cães, na Austrália. Quando se analisou a presença de anticorpos anti- *B. canis*, nos diferentes municípios, alguns apresentaram prevalência superior aos demais, como por exemplo, Seropédica, Mangaratiba e Piraí. Contudo, não houve diferença significativa entre as mesorregiões. Esse resultado demonstra que, dentro das mesorregiões, alguns municípios possuem condições mais propícias ao agente em questão, entretanto, *B. canis* apresenta-se distribuída uniformemente entre as mesorregiões, de forma endêmica.

Apesar de IFI ser um teste bastante confiável, deve-se levar em conta que pode haver reações cruzadas, principalmente com *B. gibsoni*, levando a resultados falso-positivos (ANDERSON *et alii*, 1980). Além disso, animais jovens ou com infecção aguda podem apresentar resultados falso-negativos, na IFI (FARWELL *et alii*, 1982; VERCAMMEN *et alii*, 1995; BREITSCHWERDT *et alii*, 1983). No presente estudo, três cães (1,4%), apesar de serem negativos na IFI, estavam parasitêmicos, resultado também observado por BOBADE *et alii* (1989). Nas condições em que este estudo foi realizado, não foi possível determinar a causa exata desses resultados falso-negativos, entretanto, é provável que os animais em questão estivessem na fase aguda da infecção.

Em relação à distribuição entre as diferentes faixas etárias, a partir dos 5 anos de idade, a prevalência de *B. canis*, diagnosticada pelo método de IFI, foi de 63,8%, sendo estatisticamente superior às demais faixas etárias. Esses resultados estão de acordo com TABOADA *et alii* (1992), que afirmaram que as maiores prevalências são encontradas em cães com idade superior a 5 anos de idade (46,7%). Isso pode ser devido ao fato de animais adultos terem maior probabilidade de exposição ao agente, sendo mais estimulados imunologicamente. BOBADE & ODUYE (1986) demonstraram que, em cães jovens, com

idade inferior a um ano, a resposta imune é baixa e não se mantém, enquanto que, em cães com idade superior a um ano, a resposta imune é duradoura, provavelmente devido a infecções prévias. Além disso, cães jovens podem não produzir anticorpos suficientes para serem detectados no teste de IFI (FARWELL *et alii*, 1982), e alguns animais com infecção aguda talvez não tenham tido tempo para elaborarem resposta imunológica e produzirem anticorpos, o que normalmente só ocorre duas a três semanas após a infecção (VERCAMMEN *et alii*, 1995).

5.4- *Hepatozoon canis*

Hepatozoon canis foi diagnosticado em 39,2% dos cães examinados em áreas rurais do Rio de Janeiro. MASSARD (1979) observou parasitismo, por *H. canis*, em 31,6% de cães, em áreas rurais do Brasil. A prevalência desse parasito, quando estudada através do encontro de gametócitos circulantes, variou de 1% (BANETH *et alii*, 1996) a 22% (EKEOKOLI *et alii*, 1983). BANETH *et alii* (1996), ao utilizarem testes sorológicos, constataram que a positividade subiu de 1% para 33,1%, em estudo realizado em Israel. Contudo, no Japão, mesmo com a utilização de sorologia, somente 4,2% dos cães examinados estavam positivos para *H. canis*. Esses resultados demonstram que, mesmo utilizando um método de diagnóstico pouco sensível, a prevalência de *H. canis*, em cães de área rural do Rio de Janeiro, foi bastante alta, tendo atingindo quase 60% de cães infectados, em algumas regiões, em comparação com os resultados obtidos por outros pesquisadores. A prevalência, entre os municípios, variou da 9,1% a 59,4%, demonstrando haver grande variação de uma localidade para outra. Esse foi o mesmo resultado encontrado entre as três mesorregiões, onde houve diferença estatística significativa entre elas. Na

Mesorregião do Médio Paraíba, que compreende os municípios de Barra do Piraí e Piraí, ambos com positividade elevada para o protozoário em questão, a ocorrência foi de 56,3% dos cães infectados. A Mesorregião Metropolitana também apresentou alta prevalência (34,9%), devido principalmente aos municípios de Itaguaí e Paracambi, contudo, foi estatisticamente inferior à da Mesorregião do Médio Paraíba. Esses resultados indicam que determinadas condições epidemiológicas são necessárias para que *H. canis* seja transmitido, e que, quando elas ocorrem, a transmissão é bastante elevada. Outros estudos devem ser conduzidos no intuito de determinar quais são essas condições.

Houve coinfecção de *H. canis* com outros hemoparasitos, em 4% dos animais, o que já havia sido relatado por outros pesquisadores (MUNDIM *et alii*, 1994; O'DWYER *et alii*, 1997; GONDIM *et alii*, 1998).

No presente estudo, não foi observada diferença significativa entre a ocorrência de *H. canis*, nas quatro faixas etárias estabelecidas. EZEOKOLI *et alii* (1983) também observaram parasitismo por *H. canis*, em todas as faixas etárias, entretanto, com prevalência maior em animais com idade entre um e dois anos. Para MUNDIM *et alii*, (1994) o grupo etário mais acometido foi o de animais com menos de um ano de idade (59%). BANETH *et alii* (1997) observaram cães parasitêmicos em todas as idades, porém os grupos com maior prevalência foram os com menos de 6 meses e entre 5 e 10 anos. Os resultados do presente estudo foram diferentes, já que animais de todas as faixas etárias foram igualmente acometidos. Por ser uma infecção de caráter crônico (EZEOKOLI *et alii*, 1983), com parasitemia intermitente (BANETH *et alii*, 1995), *H. canis* pode ser observado em todas as faixas etárias. Porém, alguns autores observaram maior freqüência em animais

jovens, possivelmente, pois, na fase aguda, o número de gametócitos, encontrados na circulação, é maior, o que facilita o diagnóstico.

A parasitemia de *H. canis*, observada nos cães infectados, foi bastante baixa, não ultrapassando 3% dos neutrófilos/monócitos circulantes. A parasitemia de *H. canis* é muito variável, podendo ser tão baixa quanto às observadas neste estudo, ou atingirem até 60% dos neutrófilos circulantes (BANETH et alii, 1995). Assim, ELIAS & HOMANS (1988) observaram de 6 a 43% dos neutrófilos circulantes infectados, e BANETH *et alii* (1996) observaram variação de 1 a 10%. Já GONDIM *et alii* (1998) encontraram cães com parasitemia inferior a 0,5%. Por outro lado, VINCENT-JOHNSON *et alii* (1997a,1997b) afirmaram que, na hepatozoonose americana, raramente são encontrados gametócitos na circulação, e que, quando estes são observados, costumam não exceder a 0,1% dos leucócitos. BANETH & WEIGLER (1997) constataram alterações patológicas mais graves, em cães com alta parasitemia, do que naqueles com baixa parasitemia. Esse é um dado que necessita ser melhor pesquisado, já que, no presente estudo, não foi realizado nenhum exame clínico detalhado nos animais. Entretanto, alguns animais com parasitemia elevada estavam aparentemente saudáveis, parecendo que não há relação entre parasitemia e severidade da doença.

5.5- *Ehrlichia canis*

O diagnóstico de *E. canis*, feito por meio de esfregaço sangüíneo, é pouco sensível, pois as mórulas são raramente encontradas na circulação, ocorrendo somente nos casos agudos, e desaparecendo em aproximadamente um mês (HOSKINS, 1991a; ELIAS, 1991).

Isso pode explicar a baixa prevalência observada no presente estudo (4,8%), com poucas variações, tanto entre os municípios, quanto entre as mesorregiões. Entretanto, RAJAMANICKAM *et alii* (1985) encontraram prevalência de somente 0,2%, em cães da Malásia, ao utilizar essa técnica. BANETH *et alii* (1998) observaram uma prevalência de 63% de cães positivos, em testes sorológicos. Assim, quando se avalia a prevalência de *E. canis*, utilizando-se métodos sorológicos, a positividade pode ser bastante elevada (BROUQUI *et alii*, 1991; PARZY *et alii*, 1991; MATTHEWMAN *et alii*, 1993; PRETORIUS & KELLY, 1994). Por outro lado, mesmo utilizando-se sorologia, a prevalência pode ser baixa. Esse foi o caso de YAMANE *et alii* (1994), que observaram, em cães da Califórnia, EUA, prevalência máxima de 2,6%. A prevalência obtida por esses autores foi inferior à obtida no presente estudo, em que se utilizou metodologia menos sensível. A maneira como se procede a coleta de material, para o diagnóstico parasitológico, através de esfregaço sangüíneo, é muito importante, já que, segundo ALMOSNY (1998), o encontro de mórulas é maior, quando se utiliza a primeira gota obtida após a punção de vasos capilares, do que quando se utiliza a segunda gota.

Em relação à faixa etária, a exemplo do que acontece com *B. canis*, animais de todas as idades podem ser acometidos. EZEOKOLI *et alii* (1983) encontraram maior prevalência em animais com menos de um ano de idade. Apesar de não ser estatisticamente significativo, no presente estudo, animais com idade superior a 5 anos e animais com menos de 6 meses foram mais acometidos (1,4% e 0,69%) do que os demais. Uma explicação possível, para esse resultado, é infecção aguda, nos animais jovens, e reagudização, nos animais velhos, que poderiam estar mais debilitados, favorecendo a infecção.

O encontro de um monócito, parasitado por uma mórula de *E. canis* e um gametócito de *H. canis*, já havia sido relatado por PENZHORN & LANGE (1990).

5.6- Diagnóstico sorológico de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi lato sensu* pelo método de ELISA indireto.

A prevalência de *B. burgdorferi*, encontrada em cães dos EUA, variou de 1,7% (WRIGHT *et alii*,. 1997) a 53,4% (LEVY & MAGNARELLI, 1992), de acordo com a região estudada. MAGNARELLI *et alii* (1985), ao estudarem cães de uma área endêmica, para borreliose de Lyme humana, encontraram 28,6% de cães soropositivos. ROJO VASQUEZ (1997) observou somente 2,1 % de positivos, utilizando-se do método de IFI, em cães, na Espanha. Na Eslováquia, 50% dos cães pesquisados apresentaram anticorpos contra essa bactéria (STEFANCIKOV *et alii*, 1998). BANETH *et alii* (1998) encontraram 10% de cães soropositivos para *B. burgdorferi* em Israel.

No Brasil, a prevalência de *B. burgdorferi*, em cães, foi pesquisada por JOPPERT (1996), que encontrou prevalência de 9,7%, e por SOARES *et alii* (1999a), que observaram prevalência de 20%. Assim, os resultados encontrados, no presente estudo (15,58%), estão próximos do que vem sendo observado no Brasil, e de acordo com a prevalência em áreas endêmicas de outros países. A prevalência uniforme de anticorpos anti- *B. burgdorferi* entre os diferentes municípios, e entre as mesorregiões, é um indicativo da presença de *B. burgdorferi*, em áreas rurais do Rio de Janeiro, e de sua ampla distribuição.

Não houve diferença significativa entre a ocorrência de *B. burgdorferi* e as faixas etárias a partir de 6 meses de idade. Entretanto, cães com idade superior a 5 anos foram os

que tiveram maior positividade (26,5%). Esses resultados estão de acordo com o que foi observado por outros pesquisadores. GREENE *et alii* (1988) encontraram cães positivos, pelo método de IFI, em todas as faixas etárias, com maior prevalência em animais de um a cinco anos. MAGNARELLI *et alii* (1985) observaram maior número de casos positivos, na IFI, em cães com idade superior a 4 anos. JOPPERT (1996) não observou diferença entre as faixas etárias. Cães, com idade inferior a 6 meses de idade, podem não ter sido expostos ao agente, ou não terem produzido anticorpos suficientes para serem detectados no teste de ELISA. A partir dessa idade, estímulos constantes manteriam a produção de anticorpos em níveis suficientes para serem detectados nos testes sorológicos.

Os vetores da doença de Lyme são carrapatos do gênero *Ixodes*: *I. ricinus,* na Europa, e *I. scapularis* (= *I. dammini*) e *I. pacificus,* nos EUA (LANE *et alii*, 1991). Contudo, outras espécies já foram encontradas naturalmente infectadas com *B. burgdorferi* ou espécies correlatas, tais como *D. variabilis*, *A. maculatum* e *A. americanum* (LANE *et alii*, 1991; BARBOUR *et alii*, 1996). No Brasil, ainda não se sabe qual o carrapato vetor de *B. burgdorferi*; entretanto, *A. cajennense* é considerado como um dos prováveis vetores.

A borreliose de Lyme é uma doença complexa, muito pesquisada no mundo inteiro, mas que só recentemente vem sendo estudada no Brasil (FONSECA *et alii*, 1996; YOSHINARI *et alii*, 1997; SOARES *et alii*, 1999a e 1999b). Estudos epidemiológicos são importantes para caracterizar-se as regiões em que o agente está presente, seus reservatórios e os vetores envolvidos. A epidemiologia e a apresentação clínica das borrrelioses modificam-se, de acordo com a região estudada, devido à variação de cepas, vetores e ecossistemas (YOSHINARI *et alii*, 1997). Sabe-se que títulos de anticorpos não indicam doença, mas sim, exposição ao agente (GREENE, 1990). Entretanto, cães com sorologia

positiva são considerados como indicadores do risco de transmissão do agente ao homem (LINDEMMAYER *et alii*, 1991). Dessa forma, a prevalência observada, neste estudo, indica a presença da *B. burgdorferi lato sensu*, nas regiões pesquisadas, e, assim, eventuais casos de infecção humana podem ocorrer nessas regiões.

5.7- Carrapatos

A maior prevalência de carrapatos do gênero *Amblyomma*, parasitando cães de áreas rurais, está de acordo com o que foi observado por MASSARD *et alii* (1981). O carrapato *R. sanguineus*, a espécie mais associada ao cão, é encontrado principalmente em áreas urbanas e peri-urbanas. Todos os estágios parasitam o cão, justificando o encontro de adultos sobre os animais. Por outro lado, *A. cajennense* tem maior especificidade parasitária na sua fase adulta, quando parasita principalmente eqüídeos, contrastando com a baixa especificidade de seus estágios imaturos (LOPES *et alii*, 1998), fato esse observado neste estudo. Quanto a *A. aureolatum* e *A. ovale*, são espécies que parasitam o cão, inclusive no estágio adulto, mas estão associadas às áreas rurais, com características silvestres, assim, sua distribuição é mais restrita do que *A. cajennense* (ARAGÃO & FONSECA, 1961b). *Amblyomma aureolatum* parasita habitualmente cães de cidades do interior, e é freqüentemente encontrado sobre animais silvestres da mesma região. Porém, já foi descrito na cidade de Porto Alegre, em cães de rua (RIBEIRO *et alii*, 1997). Já *A. ovale* é uma espécie de hábitos nitidamente silvestres, muito raramente encontrada próximo de cidades (ARAGÃO & FONSECA, 1961b). No presente estudo, a distribuição dessas duas espécies

foi restrita, com *A. aureolatum* tendo sido observado somente em Barra do Piraí, e *A. ovale*, somente em Itaguaí, e em poucos animais.

Amblyomma cajennense foi encontrado em todos os municípios, com exceção de Seropédica e Mangaratiba. Nos municípios de Itaguaí e de Paracambi, que apresentaram as maiores ocorrências (42,7% e 39,0%, respectivamente), o número de animais, albergando essa espécie, foi equivalente ao número de animais sem esse carrapato, demonstrando a ampla distribuição de *A. cajennense*, em cães, nesses dois municípios. Em relação às mesorregiões, houve diferença significativa entre elas, com maior ocorrência na Mesorregião Metropolitana, onde 29,1% de cães estavam parasitados com *A. cajennense*. Esse resultado se deu devido à grande prevalência dessa espécie de carrapato, nos municípios de Itaguaí e Paracambi, que fazem parte dessa mesorregião. Acredita-se que a ausência de *A. cajennense*, em cães de Seropédica, se deva principalmente ao tratamento dos cães com carrapaticidas, visto que essa espécie de carrapato é abundante em na região.

A correlação positiva, entre a presença de *A. cajennense* e a ocorrência de *H. canis*, sugere a possível transmissão de *H. canis* por essa espécie de carrapato, tendo em vista a alta prevalência de *H. canis* em cães de áreas rurais, onde a prevalência de *R. sanguineus* é baixa, quando comparada com a presença de *A. cajennense*. Espécies de *Amblyomma*, encontradas parasitando cães, podem estar contribuindo para a transmissão de *H. canis*. Como já foi citado, *H. canis* pode ser transmitido por outras espécies de ixodídeos, além do *R. sanguineus*, como *H. longicornis*, *H. flava* (MURATA *et alii*, 1995) e *A. maculatum* (MATHEW *et alii*, 1998). Além disso, MASSARD (1979) já havia levantado a hipótese de transmissão desse protozoário por *A. aureolatum*. Portanto, torna-se muito importante a

realização de experimentos que possam comprovar a infecção e a transmissão de *H. canis* por carrapatos do gênero *Amblyomma* que parasitam cães no Brasil.

Amblyomma cajennense é reconhecido transmissor de *Riquettsia riquetsii* (DIAS & MARTINS, 1935; LEMOS *et alii*, 1994), agente causador da Febre Maculosa, em cães e seres humanos, no Brasil. Entretanto, devido a sua ampla distribuição, esse carrapato pode estar envolvido na transmissão de outros agentes, como por exemplo *B. burgdorferi* e *H. canis*. Dessa forma, o parasitismo de cães, por carrapatos do gênero *Amblyomma*, deve ser melhor pesquisado, assim como a possível participação desse ixodídeo, na transmissão de agentes patogênicos, a cães e seres humanos.

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado, em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, permitiu concluir que nessas áreas:

1- Os cães foram altamente acometidos pelos hemoparasitos *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*.

2- *Hepatozoon canis* foi o hemoparasito com maior prevalência.

3- O diagnóstico sorológico positivo de *Borrelia burgdorferi lato sensu*, em cães de áreas rurais, confirmou a presença dessa bactéria no Estado do Rio de Janeiro.

4- As seguintes espécies de ixodídeos parasitaram cães na seguinte ordem decrescente de ocorrência: *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale*.

5- Os resultados obtidos indicaram que *Amblyomma cajennense* é um provável transmissor de *Hepatozoon canis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, S.U., MOHAMMED, A.R., TRIMNEL, A., SANNUSI, A., ALAFIATAYO, R. Clinical and haematological findings in 70 naturally occuring cases of canine babesiosis. *J. Small Anim. Pract.*, v. 31, p.145-7, 1990.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard, 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados.* Seropédica, 1998. 115p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária- Parasitologia Veterinária)- Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, UFRRJ.

ANDERSON, B.E., DAWSON, J.E., JONES, D.C., WILSON, K.H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, p. 2838-42, 1991.

ANDERSON, B.E., SIMS, K.G., OLSON, J.C., CHILDS, J.E., PIESMAN, J.F., HAPP, C.M., MAUPIN, G.O., JOHNSON, B.J.B. *Amblyomma americanum*: a potencial vector of human ehrlichiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 49, p. 239-44, 1993.

ANDERSON, J.F., MAGNARELLI, L.A., SULZER, A.J. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 41, p. 2102-5, 1980.

ARAGÃO, H., FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 59, p. 115-30, 1961a.

ARAGÃO H., FONSECA, F. Notas de Ixodologia. IX. O complexo *Ovale* do gênero *Amblyomma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 59, p. 131-48, 1961b.

ASSIS, C.B. *Estudo de aspectos hematológico, bioquímico e imunológico em cães não esplenectomizados e esplenectomizados inoculados com* ***Babesia canis***. Botucatu, 1993. 93p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

AZUMA, Y., ISOGAI, E., ISOGAI, H., KAWAMURA, K. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *Vet. Rec.*, v.134, p. 369-72, 1994.

BANETH, G., WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 11, p. 365-70, 1997.

BANETH, G., HARMELIN, A., PRESENTEZ, B.Z. *Hepatozoon canis* in two dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 206, p. 1891-94, 1995.

BANETH, G., AROCH, I., PRESENTEY, B. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 70, p. 201-6, 1997.

BANETH, G., SHKAP, V., PRESENTEY, B.Z., PIPANO, E. *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Vet. Res. Com.*, v. 20, p. 41-6, 1996.

BANETH, G., BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C., PAPPALARDO, B., RYAN, J. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Vet. Parasitol.*, v. 74, p. 133-142, 1998a.

BANETH, G., SHKAP, V., PRESENTEY, B.Z., SAMISH, M., PIPANO, E., SAVITSKY, J. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 74, p. 299-305, 1998b.

BANSAL, S.R., GAUTAM, O.P., BANERJEES, D.P. Prevalence of *Babesia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Hissar (Haryana) and Delhi and attempts to isolate *Babesia* from humans beings. *Indian Vet. J.*, v. 62, p. 748-51, 1985.

BARBOUR, A.G., MAUPIN, G.O., TELTOW, G.J., CARTER, C.J., PIESMAN, J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease like ilness. *J. Infec. Dis.*, v. 173, p. 403-9, 1996.

BARTON, C.L., RUSSO, E.A., CRAIG, T.M., GREEN, R.W. Canine hepatozoonosis: a retrospective study of 15 naturally occuring cases. *J. Am. Hosp. Assoc.*, v. 21, p. 125-34, 1985.

BAUERFEIND, R., KREIS, V., WEISS, R., WIELER, L.H., BALJER, G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction. *Zentralbl Bakteriol.*, v. 287, p. 347-61, 1998.

BENTLEY , C.A. Preliminary note upon a leucocytozoon of the dog. *Brit. Med. J.*, v. 1, p. 1018, 1905.

BILLINGS, A.N., YU, X.J., TEEL, P.D., WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in south Texas. *J. Med. Entomol.*, v. 35, p. 474-8, 1998.

BOBADE, P.A., ODUYE, O.O. Antibody titles in naturally occurring *Babesia canis* infections in dogs. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v. 39, p. 185-8, 1986.

BOBADE , P.A., ODUYE, O.O., AGHOME, H.O. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area. *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v. 42, p. 211-7, 1989.

BOCH, J. *Babesia* infections in horses, cattle and dogs in southern Germany. *Tierarztl Prax Suppl.*, v. 1, p. 3-7, 1985.

BREITSCHWERDT, E.B. Babesiosis. In: GREENE,R.T. (Ed.). *Enfermidades infecciosas- perros y gatos* . México: Interamericana, 1993. p. 834-41.

BREITSCHWERDT, E.B., MALONE, J.B., MACWILLIAMS, P., LEVY, M.G., QUALLS, C.W., PRUDICH, M.J. Babesiosis in the Grayhound. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 182, p. 978-82, 1983.

BROUQUI, P., DAVOUST, B., HADDAD, S., VIDOR, E., RAOULT, D. Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Islands. *Vet. Microbiol.*, v. 26, p. 103-5, 1991.

CARRET, C., WALAS, F., CARCY, B., GRANDE, N., PRECIGOUT, E., MOUBRI, K., SCHETTERS, T.P., GORENFLOT, A. *Babesia canis canis, Babesia canis vogeli, Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment lenght polymorphism analysis on amplified small subunit ribossomal RNA genes. *J. Eukaryot Microbiol.*, v. 46, p. 298-303, 1999.

CARRILLO,B.J.; RESENDE, H. E. B. e MASSARD, C. L. Ehrlichiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XV, 1976, Rio de Janeiro. *Anais*... Rio de Janeiro, 1976, p.162.

CHRISTOPHERS, S.R. *Leucocytozoon canis. Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dep. Gov. India, v. 26, p.1-18, 1906.*

CHRISTOPHERS, S.R. The sexual life of *Leucocytozoon canis* in the tick. *Sci. Mem. off. Med. Sanit. Dep. Gov. India*, v. 28, p. 1-14, 1907.

CICERONI, L., BARTOLONI, A., CIARROCCHI, S., PINTO, A., GUGLIELMETTI, P., VALDEZ VASQUEZ, C., GAMBOA BARAHONA, H., ROSELLLI, M., PARADISI, F. Serologic survey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in sheep, goats and dogs in Cordillera Province, Bolivia. *Zentralbl Veterinarmed.*, v. 44, p. 133-7, 1997.

CIDE. *Fundação de informação de dados do Rio de Janeiro.* Rio de Janeiro, 1997. 80p.

CITARD, T., MAHL, P., BOULOUIS, H.J., CHAVIGNY, C., DUILHE, P. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Trop. Med. Parasitol.*, v. 46, p. 172-9, 1995.

COLES, J.O.W.A. Classification of *Rickettsia* pathogenic to vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci., v.* 56, p. 457-62, 1953.

COSTA, H.M.A., BATISTA JÚNIOR, J.A., FREITAS, M.G. Endo e ectoparasitos de *Canis familiaris* em Belo Horizonte. *Arq. Esc. Vet.*, v. 16, p. 103-12, 1962.

COSTA, J.O., BATISTA JÚNIOR, J.A., SILVA, M., GUIMARÃES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte- Brasil. *Arq. Esc. Vet.*, v. 25, p. 199-200, 1973.

CRAIG, T.M. Hepatozoonosis. In: GREENE, R.T. (Ed.). *Enfermidades infecciosas-perros y gatos*: México: Interamericana, 1993, p.816-23.

CRAIG, T.M., SMALLWOOD, J.E., KNAUER, K.W., MCGRATH, J.P. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic and hematologic findings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 173, p. 967-72, 1978.

DAVOUST, B., PARZY, D. Ehrlichiose canine- surveillance épidemiologique dans les chenils militaires du Sud-Est. *Rec. Med. Vet.*, v. 165, p. 373-7, 1989.

DAVOUST, B., MACKOWOAK, M., MOREAU, Y. Ehrlichiose canine. Enquête épidemiologique. *Rec. Med. Vet.*, v. 162, p. 471-5, 1986.

DELL'PORTO, A. *Estudo da ocorrência de* ***Babesia canis*** *(Piana & Galli-Valerio, 1895) em cães de rua da cidade de São Paulo. Avaliação de métodos de diagnóstico e características do quadro hemático*. São Paulo, 1986. 95p. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Instituto de Ciências e Biomédicas, Universidade de São Paulo.

DEPLAZES, P., GUSCETTI, F., WUNDERLIN, E., BUCKLAR, H., SKAGGS, J., WOLFF, K. Endoparasite infection in stray and abandoned dogs in southern Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.*, v. 137, p. 172-9, 1995.

DIAS, E., MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil: a summary. *Am. J. Trop. Med.*, v. 19, p. 103-8, 1939.

DONATIEN, A.& LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une *Rickettsia* du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v. 28, p. 418-9, 1935.

DROLESKEY, R.E., MERCER, S.H., DE LOACH, J.R., CRAIG, T.M. Ultrastructure of *Hepatozoon canis* in the dog. *Vet. Parasitol.*, v. 50, p. 83-99, 1993.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *Ehrlichia canis*. *J. Small Anim. Pract.*, v. 33, p. 540-3, 1991.

ELIAS, E., HOMANS, P.A. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings. Treatment. *J. Small Anim. Pract.*, v. 29, p. 55-62, 1988.

EWING,S.A. Canine ehrlichiosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 13, p. 331-53, 1969.

EWING, S.A., DAWSON, J.E., KOCAN, A.A., BARKER, R.W., WARNER, C.K., PANCIERA, R.J., FOX, J.C., KOCAN, K.M., BLOUIN, E.F. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v. 32, p. 368-74, 1995.

EZEOKOLI, C.D., OGUNKOYA, A.B., ABDULLAHI, R., TEKDEK, L.B., SANNUSI, A., ILEMOBADE, A.A. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. *J. Small Animal. Pract.*, v. 24, p. 445-60, 1983.

FARWELL, G.E., LE GRAND, E.K., COBB, C.C. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, p. 507-11, 1982.

FLECHTMANN, C.H.W. *Ácaros de importância médico-veterinária*. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990, p.192.

FONSECA, A.H, ISHIKAWA, M.M., SOARES, C.O., MASSARD, C.L., YOSHINARI, N.H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. *Rev. Univ. Rural Ser. Cienc. Vida.*, v. 18, p. 85-9, 1996.

FREIRE, J.J. Revisão das espécies da família Ixodidae. *Rev. Med. Vet.*, v. 8, p. 1-16, 1972.

GAUNT, P.S., GAUNT, S.D., CRAIG, T.M. Extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with hepatozoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 182, p. 409-10, 1983.

EWING, S.A., DAWSON, J.E., KOCAN, A.A., BARKER, R.W., WARNER, C.K., PANCIERA, R.J., FOX, J.C., KOCAN, K.M., BLOUIN, E.F. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v. 32, p. 368-74, 1995.

EZEOKOLI, C.D., OGUNKOYA, A.B., ABDULLAHI, R., TEKDEK, L.B., SANNUSI, A., ILEMOBADE, A.A. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. *J. Small Animal. Pract.*, v. 24, p. 445-60, 1983.

FARWELL, G.E., LE GRAND, E.K., COBB, C.C. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, p. 507-11, 1982.

FLECHTMANN, C.H.W. *Ácaros de importância médico-veterinária*. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990, p.192.

FONSECA, A.H, ISHIKAWA, M.M., SOARES, C.O., MASSARD, C.L., YOSHINARI, N.H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. *Rev. Univ. Rural Ser. Cienc. Vida.*, v.18, p. 85-9, 1996.

FREIRE, J.J. Revisão das espécies da família Ixodidae. *Rev. Med. Vet.*, v. 8, p. 1-16, 1972.

GAUNT, P.S., GAUNT, S.D., CRAIG, T.M. Extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with hepatozoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 182, p. 409-10, 1983.

GAUTHIER, D.T., MANSFIELD, L.S. Western immunoblot analysis for distinguishing vaccination and infection status with *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 11, p. 259-65, 1999.

GOLUBIC, D., RIJPKEMA, S., TKALEC MAKOVEC, N., RUZIC, E. Epidemiologic, ecologic and clinical characteristics of Lyme borreliosis in Northwest Croatia. *Acta. Med. Croatica*, v. 52, p. 7-13, 1998.

GONDIM, L.F.P., KONAYAGAWA, A., ALENCAR, N.X., BIONDO, A.W. TAKAHIRA, R.F., FRANCO, S.R.V. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Vet. Parasitol.*, v. 74, p. 319-23, 1998.

GOODMAN, L.A. Simultaneos confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann. Mathe. Stat.*, v. 35, p. 716-25, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneus confidence interval for multinomial proportions. *Technometrics*, v. 7, p. 247-54, 1965.

GOSSETT, K. A., GAUNT, S.D., AJA, D.S. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 21, p. 265-7, 1985.

GREENE, R.T. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. *J. Vet. Int. Med.*, v. 4, p. 167-71, 1990.

GREENE, R.T., LEVINE, J.F., BREITSCHWEDT, E.B., WALKER, R.L., BEKHOFF, H.A. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in North Carolina. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 473-6, 1988.

HARMELIN, A., DUBEY, J.P., YAKOBSON, B., NYSKA, A., ORGAD, U. Concurent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. *Vet. Parasitol.*, v 43, p. 131-6, 1992.

HAUSCHILD, S., SHAYAN, P., SCHEIN, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. *Parasitol. Res.*, v. 81, p. 638-42. 1995.

HERVAS, J., CARRASCO, L., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histological and ultrastructural study. *Vet. Rec.*, v. 137, p. 518-9, 1995.

HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. *Can. Pract.*, v.16, p. 13- 21, 1991a.

HOSKINS, J.D Tick-borne zoonoses: Lyme Disease, Ehrlichiosis, and Rocky Mountain Spotted Fever . *Small Anim.*, v. 6, p. 236-43, 1991b.

HOVIUS, K.E., BEIJER, B., RIJPKEMA, S.G., BLEUMINK-PLUYM, N.M., HOUWERS, D.J. Identification of four *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in *Ixodes ricinus* ticks collected from Dutch dogs. *Vet. Q.*, v. 20, p. 143-5, 1998.

HOVIUS, K.E., RIJPKEMA, S.G., WESTERS, P., VAN DER ZEIJST B.A., VAN ASTEN, F.J., HOUWERS, D.J. A serological study of cohorts of young dogs naturally exposed to *Ixodes ricinus* ticks, indicates seasonal reinfections to *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Vet. Q.*, v. 21, p. 16-20, 1999.

HUXSOLL D.L., HILDERBRANDT, P.K., NIMS, R.M., WALKER, J.S. Tropical Canine Pancytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 157, p. 1627-32, 1970.

HUXSOLL D.L., HILDERBRANDT, P.K., NIMS, R.M., FERGUSON, J.A., WALKER, J.S. *Ehrlichia canis*- The causative agent of a haemorrhagic disease of dogs. *Vet. Rec.*, v. 85, p. 587, 1969.

IBRAHIM, N.D.G., RAHAMATHULLA, P.M., NJOKU, C.O. Neutrophil myeloperoxidade deficiency associated with canine hepatozoonosis. *Int. J. Parasitol.*, v. 19, p. 915-8, 1989.

INOKUMA, H., YAMAMOTO, S., MORITA, C. Survey of tick-borne diseases in dogs infested with *Rhipicephalus sanguineus* at a Kennel in Okayama Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 61, p. 761-3, 1998.

INOKUMA, H., OHNO, K., YAMAMOTO, S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozzon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 61, p. 1153-5, 1999.

JAMES, S.P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. *Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dep. Gov. India.*, v. 14, p. 1-13, 1905a.

JAMES, S.P. A new *leucocytozoon* of dogs. *Br. Med. J.*, v. 1, p. 1361, 1905b.

JAUREGUI LATORRE, E., LOPEZ GIRON, M. Canine hepatozoonosis. *Vet. Int.*, v. 7, p. 30-8, 1995.

JOHNSON, E.M., EWING, S.A., BARKER, R.W., FOX, J.C., CROW, D.W., KOCAN, K.M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, v. 74, p. 277-88, 1998.

JOHNSON, R., SCHMID, G.P., HYDE, F.W., STEGERWALT, A.G., BRENNER, D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 34, p. 496-7, 1984.

JOPPERT , A.M. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 33, p. 181, 1996.

KEEFE, T.J., HOLLAND, C.J., SALYER, P.E., RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 181, p. 237-8, 1982.

KORDICK, S.K., BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C., SOUTHWICK, K.L., COLITZ, C.M., HANCOCK, S.I., BRADLEY, J.M., RUMBOUGH, R., MCPHERSON, J.T., MACCORMACK, J.N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 2631-8, 1999.

KUEHN, N.F., GAUNT, S.D. Clinical and haematological findings in canine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 186, p. 355-8, 1985.

LABRUNA, M.B., HOMEM, V.S.F., HEINEMANN,M.M.B., FERREIRA NETO, J.S. Ticks from dogs in Uruará, Eastern Amazon-Brazil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, XI, 1999, Salvador. *Anais*... Salvador, 1999, p. 86.

LANE, R.S., PIESMAN, J., BORGDORFER, W. Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 36, p. 587-609, 1991.

LEMOS, E.R.S., MACHADO, R.D., COURA, J.R. Rocky Mountain Spotted Fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 497-501, 1994.

LEMOS, E.R.S, MELLES, H.H., COLOMBO, S., MACHADO, R.D., COURA, J.R. GUIMARÃES, M.A., SANSEVERINO, S.R., MOURA, A. Primary isolation of spotted fever group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hidrochaeris* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 273-5, 1996.

LEMOS, E.R.S, MACHADO, R.D., PIRES, F.D., MACHADO, S.L., DA COSTA, L.M., COURA, J.R. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 92, p. 477-81, 1997.

LEVY, M.G., BREITSCHWERDT, E.B., MONCOL, D.J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Caroline. *Am. J. Vet. Res.*, v. 48, p. 339-41, 1987.

LEVY, S.A., DREESEN, D.W. Lyme borreliosis in dogs. *Canine Pract.*, v. 17, p. 5-14, 1992.

LEVY, S.D., MAGNARELLI, L.A. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdoferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 200, p. 344-7, 1992.

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

LINDENMAYER, J.M., MARSHALL, D., ONDERDONK, A.B. Dogs as sentinels for Lyme disease in Massachusetts. *Am. Public. Health*, v. 81, p. 1448-55, 1991.

LINHARES, G.F.C., MASSARD, C.L., ARAÚJO, J.L.B., ALVES, L.C. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. *Arq. Univ. Fed. Rural Rio J.*, v. 15, p. 85-91, 1992.

LISSMAN, B.A., BOSLER, E.M., CAMAY, H., ORMISTON, B.G., BENACH, J.L. Spirochetes associated with arthritis (Lyme disease) in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 185, p. 219-20, 1984.

LOPES, C.M., LEITE, R.C., LABRUNA, M.B., DE OLIVEIRA, P.R., BORGES, L.M., RODRIQUES, Z.B., DE CARVALHO, H.A., DE FREITAS, C.M., VIEIRA JÚNIOR, C.R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 346-51, 1998.

MACINTIRE, D.K, VINCENT-JOHNSON, N., DILLON, A.R., BLAGBURN, B., LINDSAY, D., WHITLEY, E.M., BANFIELD, C. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989- 1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 210, p. 916-22, 1997.

MAEDA, K, MARKOWITTZ, R.C., HAWLEY, R.C., RISTIC, M., COX, D., MCDADE, J.E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.*, v. 316, p. 853-6, 1987.

MAGNARELLI, L.A., ANDERSON, J.F. Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in Northeastern United States. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2857-60, 1993.

MAGNARELLI, L.A., ANDERSON, J.F., KAUFMANN, A.F., LIEBERMAN, L.L., WHITNEY, G.D. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 186, p. 955-9, 1985.

MAKIMURA, S., KINJO, H. Cytochemical identification of canine circulating leucocytes parasitized by the gametocyte of *Hepatozzon canis*. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 53, p. 963-5, 1991.

MARTINOD, S., LAURENT, N., MOREAU, Y. Resistence and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. *Vet. Parasitol.*, v. 19, p. 245-54, 1986.

MASSARD,, C. A., MASSARD, C.L., REZENDE, H.E.B. Carrapatos de cães de áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, VI, 1981, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte, 1981 , p.201.

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

MATHER , T.N., FISH, D., COUGHLIN, R.T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme Disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 205, p. 186-8, 1994.

MATHEW, J.S., EWING, S.A., PANCIERA, R.J., WOODS, J.P. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson et al., 1997 to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. *Vet. Parasitol.*, v. 80, p. 1-14, 1998.

MATHEW, J.S., EWING, S.A., BARKER, R.W., FOX, J.C., DAWSON, J.E., WARNER, C.K., MURPHY, G.L., KOCAN, K.M. Attempted transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture. *Am.J.Vet.Res.*, v. 57, p. 1594-8, 1996.

MATTHEWMAN, L.A, KELLY, P.J., MAHAN, S.M., SEMU, D., TAGWIRA, M., BOBADE, P.A., BROUQUI, P., MASON, P.R., RAOULT, D. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe. *S. Af. Vet. Assoc.*, v. 64, p.111-5, 1993 a

MATTHEWMAN, L.A, KELLY, P.J., BOBADE, P.A., TAGWIRA, M., MASON, P.R., MAJOK, A., BROUQUI, P., RAOULT, D. Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. *Vet. Rec.*, v. 133, p. 344-6, 1993 b.

MCCULLY, R.M., BASSOON, P.A., BIGALKE, R.D., DE VOS, V., YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 42, p. 117-34, 1975.

MCDADE, J. E. Ehrlichiosis- a disease of animals and humans. *J. Infect. Dis.*, v. 161, p. 609-17, 1990.

MCKENNA, P., CLEMENT, J., VAN DIJCK, D., LAUWERYS, M., CAREY, D., VAN DEM, B., BIGAYGNON, C., CANINE, G. Canine Lyme disease in Belgium. *Vet. Rec.*, v. 136, p. 244-7, 1995.

MELHORN, H., SCHEIN, E., VOIGT, W.P. Ligth and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*. *J. Parasitol.*, v. 66, p. 220-8, 1980.

MORAES, J.D., DAWSON, J.E., GREENE, C., FILIPE, A.R., GALHARDS, L.C., BACELLAR, F. First European case of ehrlichiosis. *Lancet*, v. 338, p. 633-4, 1991.

MUNDIM, A.V., JACOMINI, J.O., MUNDIM, M.J.S., ARAÚJO, S.F. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 29, p. 259-61, 1992.

MUNDIM, A.V., MUNDIM, M.J.S., JENSEN, N.M.P., ARAÚJO, S.F. *Hepatozoon canis*: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. *Rev. Cent. Cienc. Biomed. Univ. Fed. Uberlândia*, v. 10, p. 89-95, 1994.

MURATA, T., INOUE, M., TATEYAMA, S., TAURA, Y., NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, p. 867-8, 1993a.

MURATA, T., SHIRAMIZU, K., HARA, Y., INOUE, M., SHIMODA, K., NAKAMA, S. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 53, p. 1097-9, 1991.

MURATA, T., INOUE, M., TAURA, Y., NAKAMA, S., ABE, H., FUJISAKI, K. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 57, p. 111-2, 1995.

MURATA, T., SHIMODA, K., INOUE, M., SHIRAMIZU, K., KANOE, M., TAURA, Y., NAKAMA, S. Seasonal periodical appearance of *Hepatozoon canis* gamont in the peripheral blood. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, p. 877-9, 1993b.

MURATA, T., INOUE, M., KANOE, M., KONO, Y., ISHIDA, M., HORIO, M., SHIMADA, M., YOKOYAMA, M., TAURA, Y., NAKAMA, S. Ultrastructure and cytochemical characteristics of leukocyte infected with *Hepatozoon canis*. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, p. 1043-5, 1993c.

NORDGREN, R.M., CRAIG, T.M. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.*, v. 16, p. 207-14, 1984.

O'DWYER, L.H., GUIMARÃES, L., MASSARD, C.L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis, Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v. 4, p. 83-4, 1997.

OGUNKOYA, A.B., ADYANJU, J.B., ALIU, Y.O. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *J. Small Anim. Pract.*, v. 22, p. 775-7, 1981.

PAGÈS, J.P., VIDOR, E., TROUILLET, J.L., BISSUEL, G., LECOINTRE, O., MOREAU, Y. Description clinique, hèmatologique et sérologique de 133 cas de babèsiose canine. *Prat. Med. Chirur. Anim. Comp.*, v. 21, p. 111-5, 1990.

PANCIERA, R.J., GATTO, N.T., CRYSTAL, M.A., HELMAN, R.G., ELY, R.W. Canine hepatozoonosis in Oklahoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 33, p. 221-5, 1997.

PANCIERA, R.J., EWING, S.A., MATHEW, J.S., LEHENBAUER, T.W., CUMMINGS, C.A., WOODS, J.P. Canine hepatozoonosis: Comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with *Hepatozoon americanum*. *Vet. Parasitol.*, v. 82, p. 261-72, 1999.

PARAENSE, W.L., VIANNA, Y.L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 44, p. 595-603, 1949.

PARZY, D., DAVOUST, B., RAPHENON, G., VIDOR, E. L'Eherlichiose canine au Senegal: enquete seroepidemiologique humaine et canine a Dakar. *Med. Trop.*, v. 51, p. 59-63, 1991.

PESTANA , B.R. O Nambyuvú. *Rev. Méd. (São Paulo)*, v. 22, p. 423-6, 1910.

PENZHORN, B.L., LANGE, A.L. *Hepatozoon* and *Ehrlichia* in the same canine neutrophil. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 61, p. 95, 1990.

PETERSEN, L.R., SAWYER, L.A., FISHBEIN, D.B., KELLEY, P.W., THOMAS, R.J., MAGNARELLI, L.A., REDUS, M., DAWSON, J.E. An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserve unit exposed to ticks. *J. Inf. Dis.*, v. 159, p. 562-7, 1989.

PRETORIUS, A.M., KELLY, P.J. Serological survey for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* in dogs from the Bloemfontein area, South Africa. *S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 69, p. 126-8, 1998.

RAJAMANICKAM, C., WIESENHUTTER, E., ZIN, F.M.D., HAMID, J. The incidence of canine hematozoa in Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.*, v. 17, p. 151-7, 1985.

REICHENOW, E. Ueber die Entwicklung von *Theileria parva*, dem Erreger des Küstenfieben der Rinder in *Rhipicephalus appendiculatus*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskh.*, v. 140, p. 223-6, 1937.

RIBEIRO, M.F.B., PASSOS, L.M.F., LIMA, J.D., GUIMARÃES, A.M. Freqüência de anticorpos fluorescentes anti- *Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 42, p. 511-7, 1990.

RIBEIRO, V.L.S., WEBER, M.A., FETZER, L.O., VARGAS, C.R.B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. *Cienc. Rural,* v. 27, p. 285-9, 1997.

ROHRBACH , B.W., HARKESS, J.R., EWING, S.A., KUDLAK, J., MCKEE, G., ISTRE, G.R. Epidemiologic and clinical characteristics of persons with serologic evidence of *Ehrlichia canis* infection. *Am. J. Public Health*, v. 80, p. 442- 5, 1990.

ROJO VASQUEZ, J. Seroprevalence of the infections caused by *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in humans and dogs in primary health care of San Andreas del Rabanedo. *Rev. Esp. Salud Publ.*, v. 71, p. 173-80, 1997.

SCHEIN, E., MELHORN, H., VOIGT, W. Eletron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus. Acta Tropica*, v. 36, p. 229-41, 1979.

SCHETTERS, T.H., KLEUSKENS, J., SCHOLTES, N.C., BOS, H.J. Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens. *Parasite Immunol.*, v. 17, p. 215-8, 1995.

SCHETTERS, T.H., MOUBRI, K., PRÉCIGOUT, E., KLEUSKENS, J., SCHOLTES, N.C., GORENFLOT, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology*, v. 115, p. 485-93, 1997.

SEAMER, J., SNAPE, T. *Ehrlichia canis* and Tropical Pancytopaenia. *Res. Vet. Sci.*, v. 13, p. 307-14, 1972.

SHKAP, V., BANETH, G., PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 6, p. 121-3, 1994.

SHORTT, H.E. Life story and morphology of *Babesia canis* in the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Indian J. Med. Res.*, v. 23, p. 885-920, 1936.

SOARES, CO., FONSECA, A.H., ISHIKAWA, M.M., MANERA, G.B., SCOFIELD, A., YOSHINARI, N.H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da baixada fluminense, Estado do Rio de janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 21, p. 111-4, 1999a.

SOARES, C.O., SCOFIELD, A., MANERA, G. B., ISHIKAWA, M.M., FONSECA, A.H., YOSHINARI, N.H. Ensaio imunoenzimático indireto na detecção de anticorpos homólogos da classe IgG contra *Borrelia burgdorferi lato sensu* em cães. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 21, p. 153-8, 1999b.

SMITH, R.D., SELLS, D.M., STEPHENSON, E.H., RISTIC, M., HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. *Am. J. Vet. Res.*, v. 37, p. 119-126, 1976.

STEERE, A.C. Lyme Disease. *New Engl. J. Med.*, v. 31, p. 586-97, 1989.

STEFANCIKOV, A., TRESOV, G., PETKO, B., SKARDOV, I., SESZTAKOV, E. ELISA comparison of three whole-cell antigens of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in serological study of dogs from area of Koice, eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.*, v. 5, p. 25-30, 1998.

STEPHENSON, E.H., RISTIC, M. Retrospective studie of an *Ehrlichia canis* epizootic around Phoenix, Arizona. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 172, p. 63-5, 1978.

STRAUBINGER, R.K., STRAUBINGER, A.F., SUMMERS, B.A., JACOBSON, R.H., ERB, H.N. Clinical manifestations, pathogenesis and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien Klin Wochenschr.*, v. 110, p. 874-81, 1998.

TABOADA, J., HARVEY, J., LEVY, M.C., BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of Babesiosis in Greyhounds in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 200, p. 47-50, 1992.

TODOROVIC, R.A. Methods of measuring the immunologic response to babesia. *In*: RISTIC, M., KREIER, J.P.(Ed), *Babesiosis*. New York: Academic Press Inc., 1981, p. 381-410.

UILENBERG, G., FRANSSEN, F.F.J., PERIÉ, N.M., SPANJER, A.A.M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.*, v. 11, p. 33-40, 1989.

VERCAMMEN, F., DE DEKEN, R., MAES, L. Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using IFAT. *Parasite*, v. 2, p. 407-10, 1995.

VINCENT-JOHNSON, N., MACINTIRE, D.K., BANETH, G. Canine hepatozoonosis: pathophysiology, diagnosis ant treatment. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 19, p.51-65, 1997a.

VINCENT-JOHNSON, N.A., MACINTIRE, D.K., LINDSAY, D.L., LENZ, S.D., BANETH, G., SHKAP, V., BLAGBURN, B.L. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *J. Parasitol.*, v. 83, p. 1165-72, 1997b.

WALKER, D.H., DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 2, p. 18-29, 1996.

WENYON, C. M. *Protozoology*, 2. New York: Willian Wood and Company, 1926. p. 784.

WLOSNIEWSKI, A., LERICHE, M.A., CHAVIGNY, C., ULMER, P., DONNAY, P., BOULOUIS, H.J., MAHL, P.H., DRUILHE, P. Étude du portage assyntomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 20, p. 75-86, 1997.

WRIGHT, J.C., CHAMBERS, M., MULLEN, G.R., SWANGO, L.J., D'ANDREA, G.H., BOYCE, A.J. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in dogs in Alabama, USA. *Prev. Vet. Med.*, v. 31, p. 127-31, 1997.

YAMANE, I., THOMFORD, J.W., GARDNER, I.A., DUBEY, J.P., LEVY, M., CONRAD, P.A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, p. 1579-84, 1993.

YAMANE, I., GARDNER, I.A., RYAN, C.P., LEVY, M., URRICO, J., CONRAD, P.A. Serosurvey of *Babesia canis, Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. *Prev. Vet. Med.*, v. 18, p. 293-304, 1994.

YOSHINARI, N.H., BARROS, J.L., BONALDI, V.L.N., ISHIKAWA, M., BATTESTE, D.M.B., PIRANA, S., FONSECA, A.H., SCHUMAKER, T.T. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, v. 52, p. 111-7, 1997.

ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H., GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.*, v. 87, p. 544-8, 1998.