UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS HEMOPARASITOSES ENDÊMICAS EM CÃES ATENDIDOS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DO RIO DE JANEIRO

Silvio Rodrigues da Silva

2022

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

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS HEMOPARASITOSES ENDÊMICAS DE CÃES ATENDIDOS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

SILVIO RODRIGUES DA SILVA

Sob a Orientação da Professora

Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

Sob Coorientação do Professor

Wagner de Souza Tassinari

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
junho de 2022

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

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

S586e

Silva, Silvio Rodrigues da, 1976-
Estudo Epidemiológico e laboratorial das principais hemoparasitoses endêmicas de cães atendidos em clínicas veterinárias do Rio de Janeiro / Silvio Rodrigues da Silva. - Seropédica, 2022.
219 f.

Orientadora: Teresa Cristina Bergamo do Bomfim.
Coorientador: Wagner de Souza Tassinari.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2022.

1. Diagnóstico clinico, sorológico e molecular. 2. Ehrlichia spp.. 3. Babesia spp.. 4. Anaplasma spp.. 5. Dirofilaria immitis . I. Bomfim, Teresa Cristina Bergamo do , 1962-, orient. II. Tassinari, Wagner de Souza , 1976-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

ATA Nº 2203/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.033934/2022-74

Seropédica-RJ, 02 de junho de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SILVIO RODRIGUES DA SILVA

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

TESE APROVADA EM 03/06/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 03/06/2022 17:07)
BRUNA DE AZEVEDO BAETA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.00.55)
Matrícula: ###475#9

(Assinado digitalmente em 03/06/2022 13:02)
TERESA CRISTINA BERGAMO DO BOMFIM
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.00.55)
Matrícula: ###486#0

(Assinado digitalmente em 26/09/2023 20:01)
NATHALIE COSTA DA CUNHA
USUÁRIO EXTERNO
CPF: ###.###.207-##

(Assinado digitalmente em 03/06/2022 17:05)
LUCIANO ANTUNES BARROS
USUÁRIO EXTERNO
CPF: ###.###.157-##

(Assinado digitalmente em 03/06/2022 13:40)
HELENA LUCIA CARNEIRO SANTOS
USUÁRIO EXTERNO
CPF: ###.###.897-##

Visualize o documento original em https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp informando seu número: **2203**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **02/06/2022** e o código de verificação: **a743575121**

Dedico esse trabalho a Deus e aos meus filhos de 4 patas: a Diva, o Rhuderalles, a Rhuanna, a Pantera e a Chumbinho além dos inúmeros animais que já passaram por minhas mãos.... Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me ajudado em todos os momentos da minha vida e por me conceder a honra de ingressar no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, oferecendo um ensino público, gratuito e de qualidade além de me guiar em todas as minhas escolhas e ultrapassar todos os obstáculos na minha trajetória pessoal e profissional.

À minha família que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis, sempre confiantes no meu potencial e principalmente minha mãe, pela serenidade de sempre passando toda confiança de que no final tudo daria certo. Ao meu pai que apesar da distância sempre esteve presente em todas as decisões com os melhores conselhos e apoio incondicional e aos meus irmãos que sempre me apoiaram em tudo, principalmente na parte profissional. E ao meu companheiro Nathã que esteve a distância ao meu lado no Mestrado e por todo o Doutorado aguentando todas as minhas frustrações, desabafos e ausências constantes. Amo muito todos vocês!

À minha orientadora Professora Doutora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim, pela orientação e pela amizade. Pela total confiança no meu trabalho reconhecendo minhas limitações me deixando a vontade com o tema de minha Tese, mas sempre com muita sabedoria em conduzir este trabalho, sendo um dos motivos para minha escolha como orientadora, e além do mais por aceitar me orientar com muita paciência, seriedade e dedicação. Meu muito obrigado, sem palavras.

Ao meu coorientador Professor Doutor Wagner de Souza Tassinari, pelo grande suporte nas análises estatísticas e nos modelos de regressão logística, sempre disposto e solícito em me orientar e de orientador se tornou um amigo, muito dedicado, inteligente e um exemplo de superação. Obrigado por me desafiar a cada conversa, mostrando o caminho e aquele puxão de orelha fundamental. Suas análises foram fundamentais para o desfecho deste trabalho.

Ao professor Doutor Huarrison Santos por aceitar a realização das análises das amostras nos protocolos de Biologia Molecular sempre com inovação e muito comprometimento, meu muito obrigado. Agradeço também aos seus alunos residentes e de mestrado que auxiliaram em algum momento de minha passagem pelo LASAVE nas reações de PCR.

Ao Médico Veterinário Doutor Matheus Dias Cordeiro, que apesar de um companheiro de laboratório e Congressos de Parasitologia Veterinária, se tornou um grande amigo quando encarou o desafio de auxiliar com revisões e análises sobre *Borrelia* spp. que não foram possíveis participar deste trabalho, mas farão parte num futuro próximo. Meu muito obrigado grande amigo de todas as horas.

Aos Médicos Veterinários Górdio Cavalcante Marinho, Elói Balerini, Eliane Paes Leme, Alex Bastos, Ana Vaillant, Fúlvio Martins Ambrósio, Roberta Rose Rocha Reis, Dianna Cruz, Elisabeth Almeida que autorizaram a coleta de dados e amostras biológicas disponibilizando os resultados dos kits de teste rápido “Snap 4Dx Plus” para estudo de hemoparasitoses com objetivo de crescimento do ensino e pesquisa na área de medicina veterinária e por todos os Médicos veterinários e auxiliares que me apoiaram e abraçaram esta causa todo momento que eram solicitados.

Aos grandes colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pelos momentos de grandes estudos compartilhados e nos momentos mais difíceis que passamos juntos e dos poucos momentos de descontração.

Aos cães que sem escolha, mas com o consentimento de seus responsáveis legais, doaram sua

imagem, seus dados epidemiológicos e as amostras biológicas que foram essenciais para a realização desse estudo.

Em especial agradeço a todos os Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, que estão na linha de frente no diagnóstico clínico e laboratorial, principalmente de doenças infecciosas e parasitárias, muitas vezes, sem apoio dos responsáveis legais por esses animais. Os Médicos Veterinários, nesse contexto são fundamentais para a Saúde Pública inserida no conceito One Health, tão negligenciada em relação ao controle e profilaxia de zoonoses, responsabilidade essa, que só é mencionada em momentos de Pandemia como a do COVID-19.

A todos que, mesmo não tendo seus nomes mencionados aqui, sabem que de alguma forma, colaboraram para o sucesso deste trabalho.

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

BIOGRAFIA

Silvio Rodrigues da Silva, filho de Alcy Pereira da Silva e Carmen Rodrigues da Silva, nasceu no dia 25 de abril de 1976, na cidade de Campos dos Goytacazes. Concluiu o ensino fundamental em 1991 no Colégio Estadual Alberto Torres, em São João da Barra. Em 1994 concluiu o ensino médio no colégio estadual Liceu de Humanidades de Campos, em Campos dos Goytacazes.

Com coragem e sonho de um futuro melhor, saiu da cidade pequena e se aventurou na cidade grande chegando sozinho ao Rio de Janeiro em 04/01/1995 e foi trabalhar no balcão de uma casa de rações ou Pet Shop conhecido como Avicolla Roller no Mercado São Bráz em Campo Grande onde tudo começou. Como vendedor de medicamentos e vermífugos, se apaixonou pelos nomes cientificos dos vermes que lia nas bulas de todas as caixas que abria para ler e decorar os nomes dos vermes. Logo começou a certeza de que iria ingressar na área de Parasitologia Veterinária.

No segundo semestre de 1996, ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Medicina Veterinária, necessitando diminuir o ritmo de estudos e o número de disciplinas para conciliar trabalho, estudo e pesquisa. Para conclusão do curso foi necessário abandonar o trabalho para obter o título de Bacharel em Medicina Veterinária em 2007.

Em 2014, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na mesma universidade, e obteve o título de Mestre em Ciências em agosto de 2016.

Em março de 2017, ingressou no doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, onde foi bolsista da CAPES até o presente momento.

Durante os anos de doutorado, o autor se dedicou integralmente as atividades relacionadas ao desenvolvimento de sua tese além da participação em congressos nacionais divulgando seu trabalho com enfoque em hemoparasitose na clínica de pequenos animais.

LISTADE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Análise univariada da prevalência (P) e intrervalos de confiança (IC95%), de cães positivos para hemoparasitos e sua associação com variáveis epidemiológicas em Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA) na zona oeste do Rio de Janeiro (2014-2019). **98**

Tabela 2. Análise da prevalência de agentes das famílias Babesiidae e Anaplasmataceae considerando sexo (macho ♂, fêmea ♀) dentro das variáveis raça Unidades Privadas de Saúde Animal da zona oeste do Rio de Janeiro (2014- 2019). **99**

Tabela 3. Análise bivariada das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança (IC 95%) de cães positivos parahemoparasitos e sua associação comvariáveisepidemiológicas em Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA) na zona oeste do Rio de Janeiro (2014-2019). **101**

Tabela 4.Análise univariada da prevalência (P) e intrervalos de confiança (IC95%), de cães positivos para hemoparasitos e sua associação com variáveis laboratoriais em Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA) da zona oeste do Rio de Janeiro (2014-2019). **102**

Tabela 5 Análise bivariada das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança (IC 95%) de cães positivos para hemoparasitos e sua associação com variáveis laboratoriais em Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA) na zona oeste do Rio de Janeiro (2014-2019). **104**

Tabela 6. Análise multivariada das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança (IC 95%) para infecção por agentes da família Babesiidae e Anaplasmataceae em cães associada a variáveis epidemiológicas e laboratoriais em Unidades Privadas de Saúde Animal da zona oeste do Rio de Janeiro (2014- 2019). **107**

CAPÍTULO II

Tabela 1. Soroprevalência das principais hemoparasitoses que acometem os cães provenientes de cinco Clínicas Veterinárias de diferentes bairros da zona oeste do Rio de Janeiro, através do "kit" de diagnóstico Snap 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA). **141**

Tabela 2. Soroprevalência das principais coinfecções de hemoparasitos que acometem os cães em cinco Clínicas Veterinárias de diferentes bairros da zona oeste do Rio de Janeiro, através do "kit" de diagnóstico Snap 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA). **141**

CAPÍTULO III

Tabela 1. Descrição demográfica e coordenadas geográficas dos locais do estudo. **164**

Tabela 2. Critérios de inclusão / exclusão para os cães suspeitos de hemoparasitoses. **166**

Tabela 3. Prevalência dos principais hemoparasitos estudados nas ClínicasVeterinárias e seus respectivos testes de diagnóstico ES, Snap 4Dx Plus e qPCR utilizando amostras de sangue de 70 cães. **171**

Tabela 4. Associação entre os resultados de teste de diagnósticos sorológico e molecular diante dos sinais clínicos e algumas co-morbidades entre os 70 cães com suspeitas e diagnóstico de *Ehrlichia* spp. *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp. **173**

Tabela 5. Perfil dos 70 cães que realizaram os métodos de diagnóstico ELISA e PCR. **174**

Tabela 6. Relação entre os 4 grupos de animais (A, B, C e D) que realizaram os métodos de diagnóstico ELISA e PCR. Número de animais positivos (n) e seus respectivos percentuais (%). **175**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Localização das cinco Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA), localizadas na zona oeste do município do Rio de janeiro. **136**

Figura 2. Resultados que podem ser obtidos no teste rápido Snap 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA) (Adaptado: https://www.idexx.com.br/pt-br/veterinary/snap-tests/snap-4dx-plus-test/). **139**

Figura 3. Resultados esperados utilizando o kit do teste rápido SNAP4Dx® Plus. 1- Negativo; 2- Resultado positivo para *Ehrlichia* spp.; 3- Resultado positivo para *Anaplasma* spp.; 4- Resultado positivo *Dirofilaria immitis*; 5- Resultado positivo para *Borrelia burgdorferi*; 6- Resultado positivo para *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.; 7- Resultado positivo para *Ehrlichia* spp. + *Dirofilaria immitis*; 8 - Resultado positivo para *Anaplasma* spp + *Dirofilaria immitis*; 9- Resultado positivo para *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *Dirofilaria immitis.* **142**

CAPÍTULO III

Figura 1. Animais com diagnóstico sorológico (SNAP 4DxPlus) de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.: A) animal com quadro clínico de intensa anemia, epistaxe, apatia, anorexia, pirexia com indicativo de transfusão sanguínea; B) animal após uma semana em tratamento com doxiciclina; C) animal com anemia, epistaxe e hematemese intensas, apatia, anorexia e prostração; D) após a contenção da epistaxe com terapêutica anti-hemorrágica, compressa de gelo, além de tranquilização para baixar fluxo sanguíneo. **176**

LISTADE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	GrausCelsius
µL	Microlitros
BOD	“Biochemical Oxygen Demand”– Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
et al	“et all ”– e colaboradores
g	Gramas
Lat	Latitude
mg	Miligramas
mL	Microlitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pb	pares de bases
PCR	“PolymeraseChainReaction” –Reação em Cadeia da Polimerase
pmoles	Picomoles
S	“South”– Sul
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UR	Umidade Relativa
W	“West”–Oeste

RESUMO

SILVA, Silvio Rodrigues da, **Estudo epidemiológico e laboratorial das principais hemoparasitoses endêmicas de cães atendidos em clínicas veterinárias do Rio de Janeiro, Brasil. 2022.** 209p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A clínica veterinária de pequenos animais desempenha importante papel no diagnóstico, tratamento, controle e profilaxia das principais enfermidades que acometem os cães. As hemoparasitoses representam a enfermidade parasitária mais comum, independente do sexo, idade e raça, sendo considerada endêmica no Rio de Janeiro. O primeiro capítulo teve como objetivo analisar os aspectos laboratoriais e epidemiológicos envolvidos na prevalência de hemoparasitos. Animais com trombocitopenia, monócitos ativados e anêmicos, foram os que apresentaram maior risco de infecção por hemoparasitos, sendo que os aspectos relevantes foram o porte do animal e presença de carrapatos. O segundo capítulo apresentou como objetivo analisar a soroprevalência dos principias hemoparasitos na clínica de pequenos animais em cinco clínicas veterinárias utilizando o kit Snap 4Dx®Plus. Dos 1.132 exames a soroprevalências de hemoparasitos foi de 44,3% para pelo menos um agente, sendo *Ehrlichia* spp. (33,3%), com maior prevalência, seguida de *Dirofilaira immitis* (7,1%), *Anaplasma* spp. (3,7%) e *B. burgdorferi* (0,3%). Nos casos de coinfecções, a soroprevalência foi de 16,2 %, sendo a maior de *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. (7,9 %). O terceiro capítulo, objetivou analisar o perfil de cães suspeitos de hemoparasitoses, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp. na rotina da clínica médica. Amostras de 70 cães domiciliados foram coletadas e realizadas associações entre animais positivos e negativos nos testes sorológicos e molecular, diante dos principais sinais clínicos. Todos os animais incluídos, apresentavam pelo menos três sinais clínicos e alterações laboratoriais sugestivas de hemoparasitose. As amostras de sangue foram analisadas por esfregaço, sorologia e qPCR. A prevalênciade *Ehrlichia* spp. foi de 34,3% e 37,1%, *Anaplasma* spp. 11,4% e 11,4% e *Babesia* spp. 11,6% e 8,6% na sorologia e qPCR respectivamente. O parasitismo geral dos tres agentes para as tres técnicas variou entre 1,4% a 65,7 %. Não houve diferenca significativa entre os testes de Sorologia e Biologia molecular. Animais com epistaxe foram 100% positivos para *Ehrlichia* spp. na Sorologia e 80% na PCR. A associação entre sorologia, PCR, sinais clinicos e hematológicos foi decisivo para identificar e selecionar o perfil dos cães com percentual de animais expostos e doentes 6 vezes maior que o de animais não expostos e sadios permitindo a tomada de decisão para inicio de tratamento.

Palavras-chave: *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., epidemiologia, diagnósticos de hemoparasitoses.

ABSTRACT

SILVA, Silvio Rodrigues da. **Epidemiological and laboratory study of the main endemic hemoparasitosis in dogs treated at veterinary clinics in Rio de Janeiro, Brazil.** 2022. 181p. Tesis (Doctorate in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The small animal veterinary practice plays a crucial role in the diagnosis, treatment, control, and prevention of major diseases affecting dogs. Hemoparasitic infections are the most common parasitic diseases—regardless of sex, age, or breed—and are considered endemic in Rio de Janeiro. The first chapter aimed to analyze the laboratory and epidemiological aspects associated with hemoparasite prevalence. Animals presenting with thrombocytopenia, activated monocytes, and anemia were at the highest risk of hemoparasite infection; key associated factors included the animal's size and the presence of ticks. The second chapter aimed to analyze the seroprevalence of major hemoparasites across five small animal veterinary clinics using the SNAP 4Dx® Plus kit. Among 1,132 tests, the seroprevalence for at least one hemoparasite agent was 44.3%, with *Ehrlichia* spp. showing the highest prevalence (33.3%), followed by *Dirofilaria immitis* (7.1%), *Anaplasma* spp. (3.7%), and B. burgdorferi (0.3%). Regarding coinfections, the seroprevalence was 16.2%, with the most common combination being *Ehrlichia* spp. plus *Anaplasma* spp. (7.9%). The third chapter aimed to analyze the profile of dogs suspected of harboring hemoparasites (*Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., and *Babesia* spp.) within a clinical practice setting. Samples were collected from 70 owned dogs, and associations were examined between positive and negative results from serological and molecular tests in relation to key clinical signs. All enrolled animals exhibited at least three clinical signs and laboratory abnormalities suggestive of hemoparasitic infection. Blood samples were analyzed via smear examination, serology, and qPCR. The prevalence rates were 34.3% and 37.1% for *Ehrlichia* spp., 11.4% and 11.4% for Anaplasma spp., and 11.6% and 8.6% for *Babesia* spp., based on serology and qPCR, respectively. Overall positivity for the three agents across the three techniques ranged from 1.4% to 65.7%. There was no significant difference between the serological and molecular biology tests. Animals presenting with epistaxis tested 100% positive for
Ehrlichia spp. via serology and 80% via PCR. The combination of serology, PCR, and clinical and hematological signs was crucial for profiling the dogs, identifying a higher percentage of exposed and diseased animals compared to unexposed and healthy ones, thereby facilitating decision-making and the initiation of treatment.

Keywords: *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., epidemiology, diagnostic methods, Hemoparasitosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL **1**

2. REVISÃO DE LITERATURA **3**
2.1. ***Ehrlichia canis*** **(**Donatien & Lestoquard, 1935) **3**
2.1.1. Histórico da Erliquiose monocítica canina **3**
2.1.2. PosiçãoTaxonômica **6**
2.1.3. Ciclo Biológico e formas de transmissão **6**
2.1.4. Aspectos Epidemiológicos **7**
2.1.5. Hospedeiros vertebrados e vetores **10**
2.1.4. Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais **11**
2.1.7. Diagnóstico **15**
2.1.8. Tratamento **17**
2.2. ***Anaplasma platys*** (Harvey,1978) **19**
2.2.1. Histórico da Trombocitopenia cíclica canina **19**
2.2.2. Posição Taxonômica **22**
2.2.3. Ciclo Biológico e formas de Transmissão **22**
2.4.4. Aspectos Epidemiológicos **23**
2.2.5. Hospedeiro vertebrado e vetores **24**
2.2.6. Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais **26**
2.2.7. Diagnóstico **27**
2.2.8. Tratamento **30**
2.3. ***Babesia vogeli*** **(**Pianna & Galli-Valerio,1895**)** Reichenow, 1937 **32**
2.3.1 Histórico da Babesiose canina **32**
2.3.2. PosiçãoTaxonômica **34**
2.3.3. Ciclo Biológico e formas de Transmissão **34**
2.3.4. Aspectos Epidemiológicos **36**
2.2.5. Hospedeiros vertebrados e vetores **38**
2.3.6. Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais **41**
2.3.7. Diagnóstico **43**
2.3.8. Tratamento **44**
2.4. ***Dirofilaria immitis*** (Leidy,1856) Raillet & Henry, 1911 **46**
2.4.1. Histórico da Dirofilariose canina **46**
2.4.2. Posição Taxonômica **47**
2.4.3. Ciclo Biológico eformas de Transmissão **47**
2.4.4. Aspectos Epidemiológicos **48**
2.4.5. Hospedeiros vertebrados e vetores **49**
2.4.6. Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais **51**
2.4.7. Diagnóstico **53**
2.4.8. Tratamento **55**

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **58**

CAPÍTULO I: Aspectos laboratoriais e epidemiológicos associados a hemoparasitos das famílias Babesiidae e Anaplasmataceae em cães de Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA) da cidade do Rio de Janeiro. **88**
RESUMO **89**
ABSTRACT **90**
1 INTRODUÇÃO **91**
2 MATERIAL E MÉTODOS **94**
2.1.Origem dos dados **94**
2.2.Variáveis doe studo **95**
2.3.Análise dos dados **96**
3 RESULTADOS **97**
4 DISCUSSÃO **108**
5 CONCLUSÃO **116**
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **117**

CAPÍTULO II: Investigação sorológica das principais doenças transmitidas por Artrópodes em cães atendidos em unidades privadas de saúde animal (UPSA) da cidade do Rio de Janeiro. **129**
RESUMO **130**
ABSTRACT **131**
1 INTRODUÇÃO **132**
2 MATERIAL E MÉTODOS **135**
2.1. Local do estudo **135**
2.2. Coleta dos dados **135**
2.3. Procedimentos de diagnóstico **138**
2.5. Análise estatística **139**
2.6. Aprovação do Comitê de Bioética **139**
3 RESULTADOS **139**
4 DISCUSSÃO **143**
5 CONCLUSÃO **150**
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **152**

CAPÍTULO III: Perfil clínicio-laboratorial e interpretação diagnóstica de hemoparasitoses transmitidas por carrapatos em cães: Associação entre sorologia e biologia molecular **160**
RESUMO **161**
ABSTRACT **162**
1 INTRODUÇÃO **163**
2 MATERIALE MÉTODOS **164**
2.1. Área do estudo **164**
2.2. Amostragem **164**
2.3. Coleta dos dados clínicos e laboratoriais nos prontuários **165**
2.4. Coleta das amostras sanguíneas **166**
2.5. Procedimentos laboratoriais **167**
2.5.1. Esfregaço sanguíneo **167**
2.5.2. Kit Snap 4Dx Plus **168**
2.5.3. PCR em tempo real (*q*PCR) **168**
2.5.3.1. Extração de DNA total das amostras sanguíneas **168**
2.5.3.2. PCR em tempo real (*q*PCR) para *Anaplasma platys* **168**
2.5.3.3. PCR em tempo real (*q*PCR) para *Babesia vogeli* **169**
2.5.3.4. PCR em tempo real (qPCR) para *Ehrlichia canis* **169**

2.6. Análise Estatística **169**
2.7. Aprovação do Comitê de ética **170**
3 RESULTADOS **170**
4 DISCUSSÃO **177**
5 CONCLUSÃO **189**
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS **190**
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **191**

1. INTRODUÇÃO GERAL

As enfermidades parasitárias que acometem os cães são de grande relevância, e as hemoparasitoses merecem destaque, visto serem endêmicas no ambiente urbano. Na rotina das Unidades Privadas de Saúde Animal (U.P.S.A.) no município do Rio de Janeiro e em todo Brasil, as principais espécies envolvidas são: *Ehrlichia canis* (DONNATEI & LESTORQUE, 1935); *Anaplasma platys* (HARVEY,1978) Dumler et al. (2001); *Babesia vogeli* (PIANA & GALLI-VALERIO, 1895) Carret et al. (1999) e *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905). A transmissão destes hemoparasitos se dá pela picada ou ingestão do carrapato *Rhipicephalus sanguienus sensu lato (s.l.)*, o principal vetor biológico incriminado na transmissão, devido possuir hábito nidícola e geotropismo negativo que são características adaptativas importantes para aumento de sua prevalência e manutenção de sua população em ambiente urbano. Outro hemoparasito envolvido nesta rotina diagnóstica é um helminto da espécie *Dirofilaria immitis* (LEIDY,1856) Railliet & Henri, (1911), que possui como vetor biológico vários mosquitos da família Culicidae tendo as principais espécies: *Ochlerotatus taeniorhynchus, Culex quinquefasciatus, Anopheles albitarsis* e *Aedes* spp.

Ehrlichia canis é uma bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa pertencente a ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae responsável por causar infecções sistêmicas em animais e humanos. No Brasil, estudos têm implicado *E. canis*, como o agente causador da erliquiose monocítica canina (EMC), principal agente etiológico que afeta cães domésticos. A erlichiose canina pode apresentar três fases: aguda, subclínica e crônica que apresentam sinais clínicos inespecíficos como trombocitopenia, leucopenia, linfopenia, febre, depressão, dispneia, anorexia, linfadenopatia e perda de peso; com a fase crônica de maior gravidade com epistaxe, petéquias, equimoses, sufusões, edema periférico, insuficiência renal, anúria e choque hipovolêmico levando animal a morte.

Anaplasma platys também pertencente à família Anaplasmataceae é o agente causal responsável pela trombocitopenia cíclica canina, que aparece com maior frequência em plaquetas dos cães. A infecção é caracterizada por inclusões basofílicas com a presença de mórulas em plaquetas, podendo ser encontrada em monócitos também, com posterior desaparecimento da parasitemia e início de uma marcada trombocitopenia com persistência de forma cíclica, com a maioria dos casos assintomáticos. A ocorrência de coinfecções com *E. canis* ou *B. vogeli* é um achado muito comum, sendo necessário um teste de diagnóstico sensível e preciso para a rotina de (U.P.S.A). Ambas infecções apresentam sinais clínicos inespecíficos e quando presentes não sendo possível diferenciá-los pelo exame clínico, e em

muitos casos gerando falsos positivos.

Babesia vogeli é um protozoário piroplasmida pertencente à família Babesiidae sendo um parasita exclusivamente intraeritrocítico. Nesta espécie tem sido observada baixa a moderada patogenicidade. A doença também se manifesta sob as formas subclínica, aguda e crônica, sendo os animais jovens mais sensíveis e apresentam maior severidade da doença, podendo chegar ao óbito (SILVA, observação pessoal), além de apresentar maior ocorrência em algumas raças de cães, ainda sem predisposição racial comprovada (SILVA, observação pessoal com a raça Pitt Bull). O seu diagnóstico clínico se baseia nas alterações clínicas e laboratoriais como: palidez de mucosas, febre, ascite, icterícia e anemia discreta a severa. Já foram encontrados piroplasmas desta espécie em líquido ascítico (COTA et al., 2018). O carrapato incriminado na sua transmissão é o *R. sanguineus (s.l.)* (O'DWYER et al., 2009) havendo maior ocorrência em ambientes rurais em contraposição ao ambiente urbano, sendo encontrado outras espécies de carrapatos envolvidos na transmissão como algumas espécies do gênero *Amblyomma* (O'DWYER et al., 2009). Esta espécie pode desenvolver anemia hemolítica imunomediada ou icterícia, além de linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia e hemoglobinúria. O teste de diagnóstico específico como exemplo PCR ou ELISA deve ser escolhido para diagnóstico, visto que por se tratar de um piroplasmídeo, a tratamento é distinto de outras hemoparasitoses.

Dirofilaria immitis, espécie causadora da dirofilariose canina, é um importante nematóide filarial que normalmente habita o ventrículo direito e as artérias pulmonares de seus hospedeiros. Pode causar infecções em cães, gatos, canídeos selvagens, furões e leões marinhos. Seus hospedeiros acidentais incluem cavalos, ursos e primatas, como humanos e orangotangos. O parasita é transmitido por várias espécies de dípteros da família Culicidae pertencentes aos gêneros *Culex, Aedes, Anopheles e Ochlerotatus*. Os sinais clínicos, quando presentes, são causados por lesões vasculares progressivas induzidas pelos parasitos adultos. À medida que as lesões se tornam graves, o ventrículo direito aumenta o seu volume, o sistema circulatório perde a capacidade de compensar e a insuficiência cardíaca direita se instala. Os sinais clínicos típicos incluem tosse crônica, dispneia, intolerância a exercícios e perda de peso. A prevalência da dirofilariose canina varia de acordo com a localização geográfica, população de dípteros, população canina desprotegida, número de cães microfilarêmicos, técnica diagnóstica usada, idade, comprimento da pelagem, cor predominante dos pêlos, estilo de vida, viagens e manejo dos animais. Atualmente preconiza-se a utilização de dois testes diagnósticos para dirofilariose, visto que os cães

podem estarcom infecção oculta, ou seja, cães com diagnóstico negativo para microfilárias no exame de esfregaço sanguíneo podem desenvolver infecção causada por helmintos imaturos em filhotes com menos de seis meses de idade. Além disso infecções por um único helminto, podem não sensibilizar o método de diagnóstico molecular, sendo necessário o método sorológico e infecções com um único sexo de helminto, principalmente machos, não sensibilizam método sorológico, pois a maioria dos testes detectam fêmeas, além disso, as reações imunológicas do hospedeiro contra as microfilárias também impedem um diagnóstico preciso.

Devido ao aumento da prevalência dessas doenças com distribuição mundial, o conhecimento do perfil desses patógenos em ambiente urbano torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias preventivas em áreas que representam maior ameaça ao surgimento de zoonoses.

No CAPÍTULO I, o objetivo foi analisar os aspectos epidemiológicos e laboratoriais envolvidos na prevalência de hemoparasitos no ambiente urbano da cidade do Rio de Janeiro e determinar quais os fatores determinantes para o diagnóstico destes hemoparasitos;

O CAPÍTULO II, teve por objetivos, investigar a soroprevalência das principais hemoparasitoses que acometem cães domiciliados pertencentes a zona oeste do município do Rio de Janeiro, utilizando o kit comercial Snap 4Dx Plus® (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA), que é utilizado para a triagem na rotina das U.P.S.A. para detectar antígeno de *D. immitis*, e anticorpos para *A. phagocytophilum* /*A. platys*, *Borrelia burgdorferi*, *E.canis* / *E. ewingii*. Além da soroprevalência, verificar se há associação de hemoparasitas de acordo com as regiões de localização dos animais.

No CAPÍTULO III, o objetivo foi realizar uma análise clínica, hematológica, sorológica e biomolecular e associação ao perfil dos cães diante das três técnicas de diagnóstico: exame direto de esfregaço sanguíneo (ES), sorológico (ELISA) e biomolecular (PCR) para o diagnóstico de *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp. na rotina das U.P.S.A. no Rio de Janeiro.

2 . REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935)

2.1.1. Histórico da Erliquiose monocítica canina

As erliquias são bactérias peculiares devido a sua particularidade inerente aos micro-

organismos da família Anaplasmataceae, por serem considerados parasitos intracelulares extracitoplasmático obrigatórios parasitando leucócitos e plaquetas do hospedeiro vertebrado (ALMOSNY, 1998; RAMOS et al., 2009). Pertencentes à ordem Rickettsiales e à família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001), sua classificação taxonômica mudou, em virtude dos avanços no diagnóstico, principalmente com o advento da biologia molecular, através de ferramentas e software de bioinformática. Essa evolução permitiu conhecimento principalmente de diferentes micro-organismos de importância em sanidade animal. (DUMLER et al., 2001; DIEP et al., 2019; PERLES et al., 2022).

Diante deste cenário, o avanço no diagnóstico parasitológico permitiu o conhecimento entre os diferentes fenótipos (diagnóstico) e genótipos (capacidade vetorial) contrastantes, além dos diferentes padrões de distribuição de linhagens de *R. sanguineus*, diferenças que podem determinar a competência vetorial em relação a transmissão de *E. canis* (BURLINI et al, 2010; GRAY et al., 2013; MORAES - FILHO et al., 2015).

A primeira descrição de erliquiose foi em 1935 quando a epizootia ocorreu em cães do Instituto Pasteur na Nigéria (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935, Apud ALMOSNY, 2002). Inicialmente esta bactéria recebeu o nome de *Rickettsia canis* (HUXSOLL, 1976). No mesmo período Donatien & Lestoquard (1936) registram o primeiro caso de *R. bovis.*

Em 1940, um surto de hidropericardite infecciosa em ovelhas foi descrito do ponto de vista clínico, patológico e experimental e o diagnóstico de rickettsiose foi dado com a presença de *R. ruminantium* em vários orgãos dos animais afetados (ROETTI, 1940).

Posteriormente entre as décadas de 40 e 50, novos casos foram descritos na África do Sul, Índia e vários países, mas somente na década de 60 que após descrição da pancitopenia hemorrágica causada por *E. canis*, que acometeu cães do exército americano durante a guerra do Vietnã a doença passou a ser reconhecida, com a identificação também em diversas espécies de animais como equinos e ruminantes. (PURCHASE, 1945; PHILIP et al., 1953).

Como exemplo temos a infecção rickettisial em ovinos e caprinos no Sudão, conhecida como água do coração como uma hidropericardite como agente etiológico *E. ruminantum* (KARRAR, 1965). Um possível caso de água do coração em camelo, com raça do gado Neguni, com mortalidade de comportamento de pastoreio e produção de carne (BROW, 1960).

A epizootia da erliquiose canina no Vietnã e suas implicações para os cuidados veterinários de cães militares de trabalho, está evidente nesse artigo que descreve claramente

o impacto operacional que a erliquiose causou na década de 80 que foi seu maior número de casos. Logo a triagem sorológica de cães militares de trabalho desde o fim da guerra, aconteceu nos anos de 1980, 1981, 1982 e 1983. Os cães soropositivos eram tratados com tetraciclina oral para a eliminação da infecção com o objetivo de cura (KELCH, 1984). Neste período no Rio de Janeiro, Massard & Massard (1982) registram o primeiro caso de *E. bovis* no Brasil.

Ehrlichia canis apresenta tropismo por células do sistema mononuclear fagocítico, especialmente monócitos e macrófagos, nas quais se multiplica formando estruturas intracitoplasmáticas denominadas mórulas (HARRUS & WANER, 2011).

A doença apresenta ampla distribuição geográfica e é considerada endêmica em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente em áreas onde ocorre grande densidade do carrapato *R. sanguineus* (sl), principal vetor da infecção (DANTAS-TORRES, 2008; LORUSSO et al., 2010; HARRUS & WANER, 2011). Em função da ampla distribuição desse ectoparasita e da proximidade entre cães e ambientes urbanos, a EMC tornou-se uma das hemoparasitoses mais frequentemente diagnosticadas na clínica de pequenos animais (NEER et al., 2002).

Além da relevância clínica, a erliquiose apresenta grande importância epidemiológica, pois pode manifestar-se por meio de sinais clínicos inespecíficos ou permanecer assintomática por longos períodos, dificultando o diagnóstico e favorecendo a manutenção do agente na população canina por muitos anos de forma subclínica (HARRUS et al., 1997; WANER et al., 1997).

A primeira descrição de microrganismos associados à erliquiose canina foi realizada por Donatien & Lestoquard (1935), ao observarem estruturas intracelulares com características peculiares de morfologia e coloração em leucócitos de cães infectados na Argélia. Esses achados representaram os primeiros registros da bactéria posteriormente denominada *E. canis*. Nas décadas seguintes, novos estudos contribuíram para a caracterização da doença em diferentes regiões do mundo. Durante a década de 1960, surtos de erliquiose foram descritos em cães militares, especialmente durante conflitos no sudeste asiático, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento sobre a patogenia e a epidemiologia da enfermidade, relacionando principalmente a predisposição e gravidade a raça Pastor Alemão (HUXSOLL et al., 1970; HUXSOLL et al., 1976).

Com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais mais avançadas, incluindo métodos sorológicos e moleculares, foi possível ampliar o conhecimento acerca da biologia do agente,

das formas de transmissão e das manifestações clínicas associadas à infecção (DUMLER *et al*., 2001; HARRUS & WANER, 2011).

2.1.2. Posição Taxonômica

A classificação taxonômica desses microrganismos foi revisada ao longo das últimas décadas com base em estudos moleculares, especialmente a partir da análise do gene do RNA ribossomal 16S, permitindo melhor compreensão das relações filogenéticas entre os diferentes membros da família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001).

Segundo Dumler et al. (2001) e Garrity et al. (2006), a espécie *E. canis* apresenta a seguinte classificação sistemática:

Domínio EUBACTERIA (Haeckel, 1894) Woese et al., 1990
Filo PROTEOBACTERIA (Garrity et al., 2005)
Classe ALPHAPROTEOBACTERIA Garrityet al., 2006
Ordem RICKETTSIALES (Gieszczykiewicz, 1939) Dumler et al., 2001
Família ANAPLASMATACEAE (Philip, 1957) Dumler et al., 2001
Gênero *Ehrlichia (*Ristic & Huxsoll, 1984) Dumler et al., 2001
Espécie E. *canis (*Donatien & Lestoquard, 1935) Dumler et al., 2001

2.1.3. Ciclo biológico e formas de transmissão

O ciclo biológico de *E. canis* é heteroxeno com algumas lacunas entre seus estágios de desenvolvimento, portanto já sabemos que todo seu ciclo acontece dentro de leucócitos, mais principalmente no citoplasma de monócitos, macrófagos e linfócitos do hospedeiro vertebrado. (GREENE; HARVEY, 2015).

No carrapato, seus principais e únicos vetores biológicos, até o momento, encontraram os estágios de desenvolvimento do parasita, entretanto com sítios de desenvolvimento diferentes como: hemócitos, células epiteliais do intestino e nas glândulas salivares (SMITH et al., 1976; LEWIS et al., 1977; SWANGO et al., 1989; NICHOLSON et al., 2010; SIMO et al., 2017)

O carrapato pode permanecer infectado por 5 meses visto que *E. canis* se multiplica dentro de hemócitos e glândulas salivares, cuja secreção contém grandes concentrações de bactérias que é eliminada durante o repasto sanguíneo (LEWIS et al., 1977).

O cão doméstico suscetível principal hospedeiro vertebrado pode ser infectado por todos os estágios do carrapato, através da saliva que possui grande concentração de bactérias.

Apesar de larvas, ninfas e adultos serem potenciais vetores na transmissão, as larvas e ninfas são mais comuns se tornarem infectadas participando ativamente do processo de transmissão. (SMITH et al., 1976)

A literatura relata outra forma de transmissão, onde não ocorre participação de hospedeiro intermediário, a transmissão por transfusão sanguínea, considerada acidental de um cão infectado sem diagnóstico para um cão suscetível (WOODY, HOSKING, 1991). Apesar deste relato, acredita-se que o cão cronicamente infectado não seja o principal reservatório da doença, devido a vários aspectos epidemiológicos e biológicos inerentes aos hospedeiros vertebrados e principalmente aos invertebrados. (HILBER et al., 1986; WOODY; HOSKINS, 1991)

Já é consenso que o carrapato se torna infectado ao ingerir o sangue de cães durante os primeiros 7 a 14 dias ou até 21 dias de doença aguda. Por isso, nesta fase é possível encontrar a mórula na circulação aumentando a sensibilidade aos testes de diagnóstico, exceto com os testes sorológicos (HILBER et al., 1986; SMITH et al., 1976).

Na família Anaplasmataceae, em especifico bactérias da espécie *E. canis* são transmitidas em condições naturais e experimentais através da transmissão transestadial não existindo ainda evidência nem relatos sobre a transmissão transovariana nessa espécie (GROVES et al., 1975; SWANGO et al., 1989; LOSOS, 1986).

Desta forma os carrapatos são considerados, a principal fonte epidemiológica, sendo a mais importante na manutenção desta bactéria na natureza (LOSOS, 1986). A literatura mostra que a bacteremia nos carrapatos permite que a transmissão aconteça mesmo com carrapatos em jejum por 155 a 568 dias e 155 dias após serem infectados (LEWIS et al., 1977).

Nos carrapatos, a transmissão ocorre predominantemente de forma transestadial, permitindo que o microrganismo seja mantido durante as diferentes fases do desenvolvimento do vetor (larva, ninfa e adulto). Dessa forma, carrapatos infectados podem transmitir o agente durante novos repastos sanguíneos em hospedeiros suscetíveis (DANTAS-TORRES, 2010).

2.1.4 Aspectos Epidemiológicos

No Brasil após 16 anos de sua descoberta nas américas, a erliquiose teve o seu primeiro relato em Belo Horizonte MG (COSTA et al., 1973). Logo em seguida no Rio de Janeiro, *E. canis* com seu primeiro relato foi feito em estudo com cães da polícia militar (CARRILO et

al., 1976). E com o passar das décadas o diagnóstico de erliquiose foi sendo relatado do Sudeste para o sul do país sendo em 1985, a descrição de um caso de um cão na cidade de Santa Maria, RS e em 1988 um novo caso clínico em Curitiba, PR (KAVINSKI et al., 1988).

Com advento dos avanços no diagnóstico através das técnicas de biologia molecular a espécie *E ewingii* foi detectada pela primeira vez em cães no município de Viçosa em MG (OLIVEIRA et al., 2009).

Diversos fatores podem influenciar a ocorrência da doença, incluindo densidade populacional de cães, condições ambientais, manejo sanitário e controle de ectoparasitas. Em ambientes urbanos, a proximidade entre cães e humanos, associada à presença de carrapatos em residências e canis, contribui significativamente para a manutenção do ciclo epidemiológico da infecção (NEER et al.,2002).

A E.M.C. apresenta um dado de importância epidemiológica que até hoje sofre especulações, visto que descreve a possibilidade de disseminação da doença pela Europa através do treinamento de cães militares durante e após a guerra do Vietnã, sendo a principal raça envolvida, o cão Pastor Alemão. Esta doença tem sido descrita em todo território brasileiro com quadro clínico bem distinto em várias regiões do país (ALMOSNY, 1998).

O diagnóstico de *E. canis* tem sido feito em quase todo mundo por vários motivos relacionados com a disseminação do vetor em regiões tropicais e subtropicais dos principais continentes como Ásia, África, Europa e América considerando regiões endêmicas, sendo relatado com maior ocorrência de regiões de clima temperado (DANTAS-TORRES, 2008; HARRUS & WANER, 2011).

Não há como ser preciso para informar em que momento nas UPSA o diagnóstico por exame direto de esfregaço sanguíneo passou a ser substituído pelo método sorológico (Snap 4Dx Plus) e pelo método biomolecular (PCR, *n*PCR, *q*PCR, RT-PCR) principalmente. Em contrapartida, com essa transição foi possível observar um aumento significativo no diagnóstico positivo e diminuição dos falsos negativos em casos como: erliquiose, anaplasmose e dirofilariose, que são as hemoparasitoses mais frequentes na rotina da clínica médica no ambiente urbano.

Os métodos tradicionais para diagnóstico da erliquiose baseados em sinais clínicos, achados laboratoriais, esfregaço sanguíneo, pesquisa em capa leucocitária e testes sorológicos, já estão em desuso para diagnóstico, mas ainda utilizados somente para triagem. Diversos autores relatam baixa sensibilidade desses métodos em relação aos testes de biologia molecular, visto ainda que há uma discrepância nos estudos de prevalência visto que a fase

crônica além da fase subclínica influência nos resultados em diversas regiões afetando diretamente nos estudos de epidemiologia (MYLONAKIS et al.,2003; NAKAGHI et al.,2008; BANETH et al., 2009; RAMOS et al., 2009).

Estudos sorológicos realizados em diferentes países demonstram que a prevalência da infecção pode variar amplamente entre regiões, refletindo diferenças ambientais, climáticas e sócio econômicas (HARRUS et al., 1996). Em contrapartida, levantamentos epidemiológicos realizados no país indicam dados de soroprevalência altos de anticorpos contra ehrlichia em 70% das espécies caninas em algumas regiões, com valores maiores que algumas áreas endêmicas (VIEIRA et al., 2011).

Acredita-se que dados epidemiológicos mais precisos devem ser colhidos através do diagnóstico de PCR de aspirado de linfonodos em cães, sendo este promissor e inovador para a clínica médica de cães e gatos, devendo ser incluído na sua rotina (OLIVEIRA, 2016). Em seu trabalho, Oliveira (2016) detectou pela *n*PCR valores superiores em linfonodos ao comparar com medula óssea para a presença de DNA de *E. canis* 80% e 44% ($p < 0,05$) respectivamente com resultado semelhante ao quantificar valores proporcionais de cargas parasitárias. Os resultados encontrados nos levam a pensar de uma prática distante para o médico veterinário de pequenos animais, mas que hoje se faz necessário para esse novo universo na rotina de uma clínica veterinária.

A permuta de patógenos transmitidos por carrapatos, *R sanguineus* (sl) e outras espécies é comum. Younan et al. (2021) apresentam resultados de um surto de doença semelhante à da água do coração em camelos que matou pelo menos 2 mil animais adultos no Quênia em 2016. O diagnóstico baseado na PCR para hemoparasitas transmitidas por artrópodes, foi amplificado DNA de sequências próximas a *E. canis, E. regneryi* e *E. ruminantium*.

Com as mudanças climáticas e a antropização do ambiente silvestre através da especulação imobiliária, torna-se cada vez mais comum a presença de animais silvestres em ambiente urbano, além do deslocamento do cão doméstico sendo responsável pela permuta de patógenos comuns a esses dois ambientes. Diante deste cenário, um estudo realizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV) foi conduzido para detecção de *Ehrlichia* spp. em amostras de primatas do gênero *Callithrix* no município de Viçosa. Como resultado foi obtido uma amostra positiva para *Ehrlichia* spp. sendo este o primeiro relato desta infecção em primata. Este achado reforça a importância de um hospedeiro selvagem com potencial transmissor da erliquiose para o homem no Brasil (MAFRA et al., 2015).

A partilha de carrapatos entre cães e chacais (*Canis mansonelas*) de vida livre pode

ocorrer com a presença de ambos animais no ambiente silvestre antropizado principalmente, propiciando que os chacais possam atuar como reservatório natural para a erliquiose no Quênia (YOUNAN et al., 2021)

2.1.4. Hospedeiros vertebrados e vetores

Os cães domésticos são considerados os principais hospedeiros vertebrados de *E. canis*. Entretanto, outros canídeos, incluindo espécies silvestres, também podem atuar como reservatórios naturais do agente (HARRUS & WANER, 2011).

O principal vetor associado à transmissão da EMC é o carrapato *R. sanguineus* sensu lato (sl), amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais. Esse ectoparasita apresenta grande capacidade de adaptação a ambientes domiciliares e peridomiciliares, favorecendo sua interação com cães domésticos e contribuindo para a disseminação da doença (DANTAS-TORRES, 2010). A elevada capacidade de infestação desse carrapato e sua adaptação a ambientes urbanos representam fatores determinantes para a manutenção da infecção em populações caninas. (LABRUNA et al. 2001).

Em meio a uma diversidade de vetores artrópodes transmissores de patógenos, o carrapato marrom do cão *R. sanguíneus* (s.l.) é considerado o único e principal vetor biológico para a transmissão da E.M.C., no entanto, outras espécies são consideradas como transmissores em infecção experimental como a espécie *D. variabilis* (DANTAS-TORRES, 2008; RENE-MARTELLET et al., 2015) *Ixodes scapularis* e *I. ricinus* (DAGNONE, MORAIS e VIDOTO, 2001; NICHOLSON et al., 2010). A EMC é considerada uma das mais severas doenças transmitidas por carrapato (RENE-MARTELLET et al., 2015).

Um novo vetor para cepa de *Ehrlichia* spp. o carrapato *Amblyomma tigrinum*, foi encontrado na Argentina nas províncias de Córdoba, sendo um deles próximo a cepa *E. chaffensis* (CICUTTIN et al., 2017). Este achado levanta a especulação a respeito da importância epidemiológica que deve impulsionar estudos de patogenicidade dessas novas espécies de *Ehrlichia* spp. em cães e humanos (GUENDULAIN et al., 2021)

O conhecimento a respeito da diferença de competência vetorial entre as duas linhagens de *R. sanguineus* (s.l.) (tropical) e *R. sanguineus* (s.s.) (temperada) já é conhecido. As mesmas estão localizadas acima e abaixo respectivamente dos paralelos 24º S e 25º S que cruzam as províncias de Salta e Formosa na Argentina (MORAIS-FILHO et al., 2011). Entretanto, em 2015 um estudo posterior ainda na Argentina, Buenos Aires, foi encontrado *E. canis* infectando carrapatos *R. sanguineus* (s.s.) de linhagem temperada, o que não era esperado pela

comunidade científica de ixodologia (NAVA et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2015; CICUTTIN et al., 2017).

Pesquisadores responsáveis por investigar competência vetorial em *R. sanguineus* (s.l.) analisaram dados com ligação epidemiológica de EMC e presença de *R. sanguineus* (s.s.). Uma amostra de sangue de cão com sinais compatíveis de EMC, e mórulas em monócitos, foi isolado o DNA de *E. canis* por PCR no sangue e fêmea de *R. sanguineus* (s.s.) do mesmo cão. Esse relato é contrastante com estudos anteriores (SEBASTIAN et al., 2021).

2.1.6 Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais

A patogenia da erliquiose no decorrer das décadas desde a sua primeira descrição, tem sido um desafio devido a vários fatores: O primeiro deles reside no seu caráter multissistêmico, visto que a cada dia, principalmente nas áreas endêmicas, novos sinais clínicos têm sido observados com o passar dos anos, além das comorbidades com outros agentes infecto-contagiosos ou inerentes apenas a erliquiose, sendo os seguintes caracterizados por: alterações neurológicas, circulatórias, musculares, gastrointestinais, oftálmicas**,** ortopédicas**,** respiratórias**,** dermatológicas**,** urinárias**,** viscerais etc. (SILVA, Observação pessoal)

Outro fator desafiante está relacionado ao controle do principal vetor *R. sanguineus*, devido a ineficácia na prevenção principalmente pela falta de adesão dos tutores ao tratamento carrapaticida oral, spot on e repelente principalmente; além da exposição constante dos cães ao vetor. Os cães errantes são os principais disseminadores da infestação de carrapatos no ambiente urbano. Este cenário atual tem sido um problema antigo e negligenciado de saúde pública (LABRUNA e PEREIRA, 2001; SUCEN, 2004).

Labruna e Pereira (2001) descreve de forma detalhada o que acontece com os cães em ambiente urbano mesmo com acesso restrito a residência como casas com quintal, partilham carrapatos com cães errantes mesmo na presença de barreiras físicas, biológicas e sintéticas, mantendo desta forma, a população de carrapatos no ambiente doméstico.

A infecção por *E. canis* pode evoluir em três fases distintas: fase aguda, fase subclínica e fase crônica (HARRUS et al., 1997). A fase aguda ocorre geralmente algumas semanas após a infecção e pode ser caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, incluindo febre, apatia, anorexia, linfadenomegalia e esplenomegalia. Alterações hematológicas como trombocitopenia, anemia e leucopenia são frequentemente observadas durante essa fase (NEER et al., 2002).

Há uma classificação das fases da doença, baseada nos sinais clínicos e laboratoriais, sendo didaticamente dividida em 3 fases. A fase aguda ocorre em média 14 e podendo se estender a 21 dias pós infecção. É comum os seguintes sinais: febre, depressão, anorexia, perda de peso, secreção nasal e ocular, letargia, esplenomegalia, linfadenomegalia, trombocitopenia e anemia não regenerativa (AGUIAR et al., 2007; HASEGAWA, 2005; SILVA, 2010).

Na fase subclínica, o animal tem aparente recuperação, ou clinicamente não passou pela fase aguda devido resposta imune eficiente com sinais clínicos ausentes ou não detectáveis pelo veterinário, com infecção persistente através de titulação elevada de anticorpos. Nesta fase há alterações discretas no hemograma como: anemia não regenerativa, leucopenia e trombocitopenia, sendo sinais comum as outras fases da doença, sendo um desafio para o clínico na rotina diferenciar em que fase da doença o animal se encontra (HARRUS et al 1999). Muitos animais permanecem assintomáticos por períodos prolongados, podendo manter o agente no organismo sem apresentar sinais clínicos evidentes. Entretanto, em alguns casos, a infecção pode evoluir para a fase crônica, caracterizada por alterações hematológicas graves, incluindo pancitopenia e comprometimento da medula óssea (HARRUS & WANER, 2011).

Além das alterações hematológicas, podem ocorrer manifestações clínicas diversas, incluindo distúrbios hemorrágicos, alterações oculares, sinais neurológicos e alterações renais associadas à deposição de imunocomplexos (HARRUS et al., 1997).

Já na fase crônica, alguns casos se manifestam após presença de quadros agudos várias vezes no decorrer de sua vida devido a exposição constante às infestações por carrapatos, principalmente nos passeios na rua e parquinhos de condomínios com ambientes gramados. Nesse momento animal já não responde aos medicamentos de eleição para o tratamento e apresenta petéquias, equimose, sufusões, apatia extrema, epistaxe, hemoptise, hematoquezia, hifema, episclerite e blefarite além de outras alterações de caráter hematológico.

A fase crônica da doença pode se manifestar após meses ou anos em que animal se encontrar na fase subclínica, com persistência muitas vezes das alterações hematológicas brandas sem recuperação da trombocitopenia e dos níveis de anticorpos circulantes, mostrando como uma das causas a ineficiência ou imunocompetência do organismo animal em debelar a infecção (ALMOSNY, 2002)

Além disso é muito comum na rotina da clínica o animal sendo exposto

constantemente as infestações por carrapatos, desta forma sensibilizando o sistema imune devido exposição ao agente etiológico resultando em excessiva formação de imunocomplexos resultando para o animal, em alguns casos, um quadro de insuficiência renal aguda ou crônica (ROSA et al., 2014). As alterações nesta fase são muito severas com o comprometimento da medula óssea sendo instalada a pancitopenia (MYLONAKIS et al., 2003; NAKAGHI et al., 2008).

As alterações hematológicas mais comuns citadas em casos de erliquiose canina são: trombocitopenia, anemia não regenerativa e leucopenia (HARRUS et al., 1999; ALMOSNY, 2002). Entretanto a trombocitopenia é mais comum e frequente em todas as fases de infecção, natural ou experimental (MOREIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008) não sendo possível através dessas alterações classificar e diferenciar a fase da doença em que o animal se encontra.

Os pesquisadores que estudam erliquiose com maior frequência já evidenciaram que a infecção por *E.canis* induzem uma queda acentuada nas populações de linfócitos TCD4+, MHCII caracterizando o quadro imunossupressor da doença (HARRUS et al., 2003; HEEB et al., 2003; CASTRO et al., 2022). Na rotina de clínica médica é comum o relato por profissionais e leigos afirmarem que o animal ao se encontrar nesse estado é que ele está com imunidade baixa.

Almosny (2002) relata que a grande maioria dos casos de erliquiose os cães sobrevivem a fase aguda e ingressam na fase crônica de forma sutil, mas com longa duração, revelando uma cura clínica momentânea, porém uma falsa cura laboratorial e parasitológica.

As alterações bioquímicas também são comuns na EMC, caracterizadas por hiperproteinemia com a hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (DE CASTRO et al., 2004; ROQUEPLO et al., 2009; WATANARG, 2006). Além desses analitos, AST, FA, ALT (COSTA et al. 2015) e UR, CR e P também são comuns como alterações, porém nada como alterações patognomônicas (TROY e FORRESTER, 1990).

Alguns estudos relatam que a patogenia da EMC está relacionada à citotoxicidade mediada por anticorpos, apresentando em consequência vasculite intensa em muitos órgãos parenquimatosos e também tubulares, resultando em melena e hematoquezia. As alterações encontradas em laudos histopatológicos são descritas como infiltrado inflamatório perivascular predominante linfocítico plasmocitário (SIMPSON, 1974; KAKOMA et al., 1977; DE CASTRO et al., 2004) sendo encontrado em baço principalmente.

Como as alterações descritas e supracitadas são alterações circulatórias, visto que o

agente causal é intravascular, observa-se então alterações em vários órgãos como: nefrite intersticial, inflamação perivascular, degeneração hidrópica do fígado, meningoencefalite não supurativa, esplenomegalia e hiperplasia de cordões medulares (DE CASTRO et al. 2004).

As alterações em baço de alguns animais aleatoriamente selecionados em nossa rotina, que foram submetidos a cirurgia de esplenectomia e exame histopatológico, foi encontrado um percentual de 26% de alterações vasculares de origem inflamatória predominantemente linfocítico-plasmocitárias. Após investigar o histórico desses animais, todos foram positivos na sorologia para *E. canis*/*E. ewingii* através do teste rápido Snap 4Dx Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA) (SILVA, 2022 - Dados não publicados).

Como um parasita intracelular obrigatório, *E. canis* desenvolveu habilidades em sua engrenagem molecular a fim de evadir-se dos mecanismos imunológicos principalmente com a formação do vacúolo parasitóforo. Diante desta estratégia o que permite sua sobrevivência no hospedeiro por meio da produção de proteínas de superfície que impedem a fusão do fagolisossomo no interior dos macrófagos (WELLS e RIKIHISA, 1998).

Devido a capacidade de alcançar os tecidos, *E. canis* mantém sua persistência em diversos tecidos o que permite a produção de altos níveis de IgM e IgG o que facilita sua entrada nas células do sistema fagocitico mononuclear por opsonização e consequente manutenção nos tecidos (RISTIC; HOLLAND, 1993).

No estudo das alterações clínicas e laboratoriais no curso da erliquiose, já é consenso que principalmente na fase crônica da doença há comprometimento renal (FRANK e BREITSCHWERDT, 1999). Muitos estudos não comprovam associação entre insuficiência renal aguda e crônica à erliquiose, não sendo uma alteração muito frequente. Entretanto, estudos demonstram que a deposição de imunocomplexos nos rins podem evoluir a glomerulopatias com evolução para proteinúria (FRANK e BREITSCHWERDT, 1999; HARRUS et al., 2001; ROSA et al., 2014) sendo estas alterações mais comuns em cães idosos, com idade a partir de 7 anos, com histórico de infestações sucessivas por carrapatos e positividade persistente em testes sorológicos **(**SILVA, 2022 - dados não publicados)

Em nossa rotina clínica, observamos animais com diagnóstico de erliquiose antigo, com histórico de resolução do quadro clínico após tratamento e normalização de algumas alterações laboratoriais, com suspeita de que não haja cura parasitológica e com sorologia positiva persistente. Casos como este de recidiva, o animal retorna à clínica em estado grave com alterações como pancitopenia e azotemia com perfil nefropata caracterizado por insuficiência renal crônica grau 4 ou 5 com quadro irreversível caracterizando fase crônica

da doença com prognóstico desfavorável. (SILVA, 2022 - dados não publicados)

Alguns casos de azotemia caracterizado pelo aumento de ureia e creatinina ocorrem devido às alterações a nível molecular de células tubulares e glomerulares como consequência proteinúria em cães com *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. Essas alterações persistentes já são indicativos de alterações renais em erliquiose crônica principalmente, não podendo descartar o envolvimento de outras hemoparasitoses (BONFANTI et al., 2004; SOUSA et al., 2010).

Desde a descoberta da erliquiose os estudos conduzidos até o momento, poucos são os relatos de alterações renais associadas à infecção e imunopatogênese como ênfase a lesão renal (CODNET et al., 1992; DE CASTRO et al., 2004)

Com a evolução da medicina veterinária e o crescimento da atenção aos cuidados paliativos em casos de doenças crônicas, aumentou a visibilidade para o clínico veterinário do diagnóstico baseado nas alterações da doença a nível histopatológico e imunohistoquímico. Os achados são caracterizados por glomerulonefrite intersticial crônica multifocal com presença de infiltrado mononuclear (DE CASTRO et al., 2004)

Outras alterações encontradas a nível renal que podem ser causadas na infecção por *E. canis* são caracterizadas por alterações circulatórias de origem inflamatória em endotélio vascular responsável por infiltrado plasmocitário na junção corticomedular, edema perivascular, necrose focal além de amiloidose (CODNER et al., 1992; REARDON, PIERCE, 1981)

2.1.7 Diagnóstico

Como toda enfermidade, seja parasitária ou infecciosa e de acordo com a experiência da clínica médica, recomenda-se que os métodos de diagnóstico realizados devem ser associados aos sinais clínicos de cada animal individualmente. Sendo importante também a avaliação do cenário epidemiológico no qual animal está inserido, (MORAES-FILHO et al., 2015) isso porque em muitos casos a associação entre a clínica, anamnese e o histórico já representam boa parte do desfecho para um diagnóstico definitivo (SILVA, 2022 - Dados não publicados).

Hábitos domiciliares, exposição aos vetores, tratamento e controle tópico (shampoo, coleira e pipetas repelentes) controle externo (carrapaticida ambiental) controle interno (carrapaticida oral), histórico da enfermidade, tratamento terapêutico recente ou remoto, frequência de passeios ao pet shop ou parques e pracinhas do condomínio em contato direto com grama além de outros, são aspectos epidemiológicos importantes que auxiliam na suspeita, no diagnóstico e no controle das hemoparasitoses na rotina da clínica médica ao

longo de 20 anos (SILVA, 2022 - Dados não publicados).

Todas essas informações são cruciais para auxiliar e aumentar o sucesso no diagnóstico definitivo da maioria das hemoparasitoses, principalmente a erliquiose. Entretanto, a escolha do melhor teste diagnóstico, vai depender da avaliação do médico veterinário com associação dos aspectos epidemiológicos e os resultados de pelo menos dois testes de diagnóstico (direto e indireto) realizados como triagem, tendo como mesmo exemplo o caso da dirofilariose (TRANCOSO et al., 2020).

No diagnóstico de *Ehrlichia* spp. ou qualquer hemoparasito, algo deve ser considerado: a sensibilidade e especificidade dos testes, tanto o direto como indireto, além de considerar a fase da doença, visto que de acordo com a fase da enfermidade, alguns testes podem ter sua sensibilidade afetada gerando falsos negativos na fase aguda e falsos positivos na fase crônica (HILDEBRANDT et al., 1973; DE CASTRO et al., 2004; HARRUS e WANER, 2011).

Os locais de eleição para a coleta de material para o exame direto são: sangue total para esfregaço sanguíneo, aspirado de baço, aspirado de medula óssea e linfonodos. Entretanto poucas sensíveis para casos subclínicos (HILDEBRANDT et al., 1973)

Com a evolução do diagnóstico de hemoparasitoses a PCR (reação em cadeia de polimerase) reúne ás características importantes nos testes de diagnósticos com a sensibilidade e especificidade que neste exame em específico são altas e conseguem alta precisão na detecção do agente com baixa carga parasitária e em diferentes estágios da infecção, como aguda subclínicas e crônica (MACINTIRE et al., 2002).

Anteriormente a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para os anticorpos IgG anti-*E.canis* era considerada “padrão ouro” para o diagnóstico de erliquiose (WANER et al., 2001) A partir de 2009, de que temos conhecimento, muitos estudos relatam a PCR como padrão ouro sendo o método direto mais sensível, específico e rápido para o diagnóstico dos principais hemoparasitos na rotina de clínicas veterinárias (RAMOS et al. 2009; INOKUMA, 2004; PAULINO et al., 2008a).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) passou a ser considerada uma ferramenta importante no diagnóstico da EMC, permitindo a detecção do DNA do agente caracterizado por proteínas imunorreativas como *p*28 e *gp* 140, em fase aguda ou crônica, mesmo em amostras com baixa carga parasitária (MCBRIDE et al., 2003).

A variação de técnicas e resultados das modificações da PCR vem sendo desenvolvidas com objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia tornando-a mais

precisa e assertiva no diagnóstico das hemoparasitoses, sendo possível caracterizar diferentes espécies (DUMLER et al., 2001; DUARTE et al., 2008). Como exemplo temos nested PCR (*n*PCR) (MURPHY et al. 1998, MARTINS et al. 2005) seminested PCR (*sn*PCR) (BIRKENHEUER et al., 2003) PCR combinada com análise de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (DAGNONE et al., 2003; TEFFERIES et al., 2007) PCR Multiplex (LISBOA, 2010) PCR em tempo real ou Real Time PCR (LABRUNA et al., 2007)

Uma particularidade que tem sido observada na rotina da clínica médica com os cães suspeitos de erliquiose, é o diagnóstico falso negativo da PCR em sangue total, mesmo animais com sinais clínicos e laboratoriais evidentes e com suspeita da ausência de cura parasitológica e laboratorial com sorologia positiva ou negativa. Após sucessivos testes de PCR negativos, este fato nos direciona a levantar várias hipóteses : falha técnica na execução da PCR; possível sequestro do parasito para o sistema mononuclear fagocitário (SMF) como: baço, fígado, linfonodos, pulmão e medula óssea; necessidade de aumentar a acurácia do diagnóstico lançando mão da punção de medula óssea, linfonodos e baço; necessidade de enfatizar a solicitação de PCR quantitativa e suas variações como (qPCR, nPCR, snPCR, PCR Real Time, PCR multiplex) ao invés de PCR qualitativa, através de treinamento e capacitação da equipe médica no atendimento clínico para o sucesso no diagnóstico definitivo. (SILVA, observação pessoal)

No universo das diferentes técnicas de PCR, em particular o PCR em tempo real ou Real Time, se destaca perante as demais técnicas, pelo fato de permitir o acompanhamento da reação e resultados mais rápidos e com maior grau de confiança devido ser uma técnica quantitativa em relação aquelas que apresentam resultados qualitativos, sem precisar utilização de eletroforese em gel das proteínas envolvidas na infecção e risco de contaminação do brometo de etídio (NOVAIS, PIRES-ALVES, 2004)

2.1.8 Tratamento

A terapêutica da erlichiose passou por várias décadas desde a sua descoberta, com o tratamento de forma inespecífica com arsenicais e transfusões puras, resultando em altas taxas de letalidade **(**DONATIEN et al., 1935). Com o surto d**a** enfermidade que ficou conhecida como "pancitopenia tropical canina" em cães militares na Guerra do Vietnã, muitas pesquisas estavam em desenvolvimento e foi nesta época a descoberta da eficácia da tetraciclina de primeira geração como a oxitetraciclina **(**HUXSOLL et al., 1970). Com o passar do tempo o tratamento não era viável devido a utilização dos protocolos serem longos podendo chegar até

200 dias de tratamento (AMYX et al., 1971), em razão da baixa absorção da droga devido ao baixo poder lipofílico das tetraciclinas de 1ª geração, que não se mantinham nos tecidos tendo eficácia comprometida **(**HUXSOLL et al., 1972)**.**

Na década de 80, novos trabalhos continuavam sendo feitos envolvendo estudos farmacológicos e clínicos que demonstraram a superioridade da doxiciclina, uma tetraciclina de 2ª geração. A importância em ser uma molécula altamente lipossolúvel, intimamente relacionada com sua farmacocinética devido seu alto poder de absorção, distribuição, meatabolismo e eliminação, demonstrou capacidade supeiror em relação as outras moléculas podendo chegar a 100% de absorção no trato gastrointestinal mesmo com a presença de alimentos. Além disso sua capacidade de penetrar na membrana celular dos monócitos e macrófagos, ligando-se à subunidade ribossômica da bactéria inibindo a síntese proteica de forma muito eficaz **(**AMYX et al.,1980; BREITSCHWERDT et al., 1987).

No final da décado de 90, devido algumas especulações da comunidade cientifica a respeito de outras drogas que poderiam substituir ou apresentar o mesmo padrão farmacocinético, foi realizado um estudo que avaliou e comparou diferentes terapias com doxiciclina, enrofloxacina e dipropionato de imidocarb. Logo, foi através desse estudo que a comunidade científica da época consolidou a doxiciclina como o fármaco padrão-ouro mundial para tratamento de erliquiose (BREITSCHWERDT et al., 1998).

No ano de 2000, os estudos avançados em quimioterapia experimental demonstraram os efeitos diretos da doxiciclina na medula óssea e normalização dos analitos de hematologia dos cães em tratamento (SAINZ et al., 2000). Todavia, anos mais tarde, observou-se que a melhora periférica em sangue total não necessariamente indicava a eliminação parenquimatosa no baço visto que o estudo longitudinal provou que tratamentos curtos de 21 dias com doxiciclina falhavam em eliminar completamente a *E. canis* do baço, que atua como um reservatório das erliquias protegidas semelhante ao vacúolo parasitóforo, sendo conhecido por alguns autores como “santuário das erliquias”. Este achado levou a clínica veterinária pela conduta de protocolos mais longos de tratamento (HARRUS et al., 2004).

Em 2007 pesquisadores em estudo de quimioterapia antimicrobiana utilizaram a biologia molecular para demonstrar de forma definitiva que os tratamentos curtos até 14 dias com doxiciclina mantinham os cães como portadores assintomáticos, permitindo que carrapatos sem contaminação pela rickettsia voltassem a adquirir a bactéria desses animais (SCHAEFER et al., 2007). Isso aconteceu semelhante ao trabalho de pesquisadores de Jerusalém e Israel, que observaram cães, que após 2 anos de tratamento com doxiciclina,

apresentaram 100% de positividade para ehrlichia na PCR de aspirao de baço (HARRUS et al., 1998).

Nas próximas décadas, entre 2007 e 2021 novos trabalhos foram realizados para complementar o que já tinha sido documentado e chancelado. O trabalho de Falconi et al. (2012) demonstrou a diminuição da carga bacteriana nas primeiras semanas através da PCR Real time. Já em 2015 foi publicado o consenso internacional que oficializa o tratamento mundial para erliquiose sendo imperativo e recomendado 10 mg/kg de doxiciclina no mínimo 28 dias (SAINZ et al., 2015). Entretanto, Mylonakis et al. (2019) em sua revisão clínica analisou as falhas terapêuticas, a refratariedade da fase crônica e validou os parâmetros hematológicos de monitoramento que determinam o sucesso ou a necessidade de extensão do protocolo de doxiciclina, visto muitos casos de erliquiose crônica e subclínica.

Recentemente o trabalho de maior relevância descreve os "Guidelines" para o diagnóstico, tratamento e controle de erliquiose nas regiões trópicais e subtropicais onde a exposição aos vetores apresentam maior impacto e sequelas da infecção (IRWIN et al., 2021).

O trabalho mais atualizado de que temos conhecimento são de dois pesquisadores de renome, um deles brasileiro, em que detalha as variações de cepas envolvidas e sua patogenicidade, além dos impactos hematológics e tratamentos alternativos nos levando a especular resistência ou casos refratários a doxiciclina, com uso de minociclina e rifampicina (DINIZ; DE AGUIAR, 2022).

2.2 *Anaplasma platys (*HARVEY, 1978)

2.2.1 Histórico da Trombocitopenia cíclica canina

Em um passado remoto, os animais domésticos de grande e pequeno porte, principalmente ruminantes como bovinos, caprinos, ovinos, camelídeos e além também dos equinos já eram acometidos por organismos da família Anaplasmataceae (BRION, 1943).

Em 1933, Thomas e Neitz chamam atenção aos números de casos não diagnosticados de doenças relatadas no parque nacional de Kruger e enfatizam a oportunidade de pesquisas em potencial neste campo. Ainda no mesmo ano, Neitz incriminou o blesbok, um antílope endêmico na África do Sul como portador da doença da água-do-coração e da língua azul, que posteriormente foi classificado como uma bactéria, agente etiológico da cowdriose.

Em 1937, Martinaglia relata a importância do conhecimento a respeito da fauna silvestre e as enfermidades que acometem estas espécies de vida selvagem, visto o contato próximo

desses animais aos seres humanos e seus animais domésticos.

A busca pelo conhecimento a respeito das enfermidades de animais selvagens, no passado era levado em consideração somente quando os animais domésticos eram acometidos. Entretanto, os estudos sobre esta população têm ganhado interesse, devido às inúmeras publicações que enfatizam um número crescente de enfermidades de animais selvagens em ambiente urbano (MARTINAGLIA, 1937)

Em 1982, Thomas e colaboradores, registraram alguns parasitas sanguíneos em palancas negras e também 124 esfregaços de sangue em antílopes da África do Sul e Zimbabwe, que foram examinados e tiveram como resultado 7 animais positivos para *Babesia* spp. e um esfregaço de sangue foi positivo para *Anaplasma* spp. sendo esse isolado infeccioso para ovelha e não para o gado.

Posteriormente com o avanço no diagnóstico e o estudo mais aprofundado na detecção desses agentes em eritrócitos bovinos, outros achados em diversas espécies como ovinos e outros ruminantes desencadeou os primeiros relatos de inclusões nos eritrócitos bovinos sendo a descrição completa feita por Theiler em gado africano em 1910 (KOCAN et al., 2003) e também em equinos (BRION, 1943).

Em 1911, Theiler descreve uma subespécie de *Anaplasma*, *A. centrale*, menos patogênica e a qual inclusões eram com maior frequência encontradas no centro dos eritrócitos do que na margem. Após esses achados, novas descobertas de outras espécies de *Anaplasma* foram sendo conhecidas na comunidade científica como: *A. ovis* parasitando eritrócitos de ovinos, *A. bovis* infectando monócitos de bovinos (LESTOQUARD, 1924; DONATIEN e LESTOQUARD, 1924, LESSPLITTER et al., 1956) e *A. platys* o agente causador da trombocitopenia cíclica canina em plaquetas de caninos (HARVEY et al., 1978).

Com a riqueza dos achados realizados neste período, muitos estudos foram capazes de acompanhar a evolução desses agentes, principalmente *A. marginale* com estudos filogenéticos de proteínas de superfície como msp1, msp4, msp5 que são proteínas envolvidas nas interações hospedeiro-patógenos e podem evoluir mais rapidamente devido às pressões seletivas exercidas pelo sistema imunológico do hospedeiro, sendo considerado um gene mais estável para estudos filogenéticos (FUENTE et al., 2003)

Um achado comum e característico desta enfermidade é a trombocitopenia, entretanto muitos pesquisadores da época questionavam a importância de investigação a respeito, visto

que outras enfermidades virais e bacterianas cursaram com o mesmo quadro laboratorial (HARVEY et al., 1978; MYLONAKIS et al., 2003; CORREA et al., 2011) além de alterações metabólicas de origem hormonal como diabete mellitus e resistência insulínica nos casos de doença periodontal e distúrbios reprodutivos como comorbidades **(**DEEPA et al., 2014)

Diante deste desafio, Harvey et al. (1978) iniciaram estudo experimental com objetivo de descrever e acompanhar o ciclo biológico deste novo agente com características peculiares marcantes para descrever as alterações e manifestações hematológicas e a ultraestrutura do organismo Rickettsiae com o tropismo e replicação em plaquetas de cães, visto que este achado apresentava repetibilidade e poderia ser um diferencial com potencial patognomônico.

No mesmo ano, Harvey et al. (1978), obteve sucesso e respostas às especulações foram encontradas, visto que a parasitemia em megacariócitos e plaquetas de forma cíclica assim como as trombocitopenias continuam sendo os principais achados desta enfermidade causadas por *A. platys (*HARVEY et al., 1978; HARRUS et al., 1997).

Nos anos seguintes, foram feitos estudos de microscopia eletrônica com objetivo de caracterizar a o a presença de subunidades formadoras de mórulas em plaquetas, sendo a primeira descrição de *E. platys*, ocorrendo na Flórida, EUA (HARVEY et al., 1978).

Mesmo com os estudos avançando neste assunto, a comunidade científica continuava questionando os resultados visto que ainda haviam evidências que mostravam mais semelhanças morfológicas e biológicas do que diferenças entre as espécies em estudo e semelhanças entre bactérias que infectam cães como exemplo *E. canis* e bovinos como exemplo *A. marginal*, sendo estas classificadas na mesma família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001).

Novos estudos foram necessários para desvendar tamanha especulação, visto que naquele momento, os animais das regiões em estudo poderiam estar sofrendo por infecção de diversos microrganismos patogênicos e muitos questionamentos eram fundamentados e comprovados (HARVEY et al., 1978; HARRUS et al., 1997; DUMLER et al., 2001). Diante destes resultados, Anderson et al. (1992) a partir de estudos moleculares com análise de sequências de diferentes genes como 16S rRNA e *groEL* baseado nos estudos de Yu et al. (2001); Dumler et al.(2001) e Huang et al.(2005) observaram presença dos diferentes genes comum a sua espécie em estudo e também as outras espécies de bactérias como *A. phagocytophilum* e *A. marginale* além da proximidade a essas espécies com a particularidade de parasitar plaquetas e suas células precursoras os megacariócitos que são predominantes em cães jovens (TOMMASI et al., 2014).

2.2.2 Posição Taxonômica

A espécie *A. platys* está inserida na seguinte sistemática (DUMLER et al. 2001; GARRITY et al. 2006)

Domínio EUBACTERIA (Haeckel, 1894) Woese et al., 1990.

Filo PROTEOBACTERIA (Garrity et al., 2005)

Classe ALPHAPROTEOBACTERIA (Garrity et al., 2006)

Ordem RICKETTSIALES (Gieszczykiewicz, 1939) Dumler et al. (2001)

Família ANAPLASMATACEAE (Philip, 1957) Dumler et al. (2001)

Gênero *Anaplasma* Theiler, 1910.

Espécie *Anaplasma platys* (Harvey et al., 1978) Dumler et al. (2001)

2.2.3 Ciclo biológico e formas de transmissão

O ciclo de vida de bactérias do gênero *Anaplasma* tem suas particularidades de acordo com a célula do hospedeiro vertebrado parasitado e semelhanças de acordo com o artrópode vetor envolvido na transmissão. Na espécie *A. platys*, diferente das outras espécies, o parasitismo ocorre nos fragmentos de célula parasitados que são conhecidas como as plaquetas, A invasão acontece por meio de receptores de membrana também encontrados em pró-megacariócitos e megacariócitos da medula óssea. (HARVEY et al. 1978; TOMASI et al., 2014).

Após a infecção e entrada na célula hospedeira, a bactéria é envolvida por membrana vacuolar após endocitose onde ocorre divisão celular por repetidas fissões binária dentro do vacúolo formando a mórula (HARVEY et al., 1978). No decorrer do processo de infecção, alterações hematológicas iniciam com a trombocitopenia cíclica o principal achado em patologia clínica que levanta suspeita desta enfermidade na clínica médica; com picos e redução parasitária de forma intermitente e cíclica, determinando redução significativa de plaquetas no volume vascular. Esse achado pode ainda se agravar drasticamente quando esta redução ocorre de forma efetiva das plaquetas infectadas com a fagocitose feita pelos macrófagos do fígado, baço e medula óssea. (EDDLESTONE et al., 2007).

Como toda bactéria, em especial *E. canis* desenvolveu ferramentas moleculares de escape com o recrutamento de proteínas de superfície para protegê-la dentro do vacúolo parasitóforo, acredita-se que o mesmo ocorra com a maioria das bactérias da família Anaplasmataceae. (RIKIIHSA, 1991)

Além disso, várias estratégias de sobrevivência já foram relatadas para vários agentes bacterianos intracelulares como: mecanismo de escape de vacúolos, a fuga da fusão do lisossomo e tolerância ao ambiente lisossomal (EERNST et al., 1999; TENG et al., 2003).

A forma de transmissão pode se dar por fômites, artrópodes hematófagos, transplacentária e transfusão sanguínea, porém ainda existem lacunas no ciclo biológico e de transmissão, entretanto se faz necessário mais estudos para elucidar a participação de vetores e outros mecanismos. Há relatos a respeito da suspeita de transmissão por artrópodes vetores como fortemente a participação de carrapatos e piolhos ou pulgas (RUS; DRYDEN, 1997)

A capacidade de alguns membros da família Anaplasmataceae de permanecer como agente infectante gerando imunidade vitalícia e resistente à doença clínica no hospedeiro, no caso de *A. marginale*, acredita-se que ocorra o mesmo mecanismo com *A. platys* porque fornece uma fonte de sangue infeccioso para transmissão mecânica e biológica por carrapatos (SOUZA et al. 2001; KOCAN et al., 2003)

Observa-se também outra característica intrinsicamente ligada ao carrapato *R. sanguíneus* visto que a capacidade de sobreviver em ambientes diversificados e adversos por longo período de jejum e sem limitações geográficas, fazendo deste parasito um dos mais importantes candidatos a vetor competente desta enfermidade (DANTAS-TORRES, 2008).

2.2.4. Aspectos epidemiológicos

A comunidade científica tem observado em diversos estudos que a prevalência e distribuição geográfica dos agentes causadores de doenças estão intimamente ligadas à distribuição dos vetores competentes e responsáveis pela amplificação do agente na natureza. De acordo com as condições viáveis no hospedeiro vertebrado ou invertebrado e dos aspectos biológicos do agente em questão (KOCAN et al., 2004; COSTA-JUNIOR, 2007).

Acompanhando a prevalência do vetor artrópode com distribuição mundial, *A. platys* tem sido reportado em diversos países como: diferentes áreas dos EUA (FRENCH; HARVEY, 1983); Bélgica (HEYMAN et al. 2007); Brasil (FERREIRA et al., 2007); Grécia (MILONAKIS et al., 2004); França (INOKUMA et al., 2002); Espanha (SAINZ et al., 1999), Japão entre outros (INOKUMA et al., 2002)

No Brasil a prevalência de *A. platys* varia entre os valores de 4,08% a 85,7% pelo método de biologia molecular com a variação dos valores de prevalência de acordo com vários fatores e aspectos que influenciam como: localidade do estudo, método de detecção,

idade dos animais, exposição aos vetores, fase aguda da doença (COSTA-JUNIOR, 2007; DAGNONE et al., 2003; SOUZA et al., 2004; SILVA et al., 2016; TOMASI et al., 2014)

2.2.5. Hospedeiros vertebrados e vetores

Os principais hospedeiros de *A. platys* até o momento são os cães de ambiente domiciliar, desenvolvendo a doença conhecida como trombocitopenia infecciosa cíclica canina. Há relatos de outros hospedeiros com diagnóstico direto de esfregaço sanguíneo e em técnicas de biologia molecular em felinos domésticos (SANTARÉM et al., 2005; CORREA et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013). Em alguns animais não comuns como em ovelhas, há relatos de infecções raras nos EUA (DUPLESSIS et al., 1997).

Esta hemoparasitose passou a adquirir importância em saúde pública a partir de trabalhos publicados após detecção de mórulas e DNA em amostras humanas apresentando potencial zoonótico (ARRAGA-ALVORADO et al., 1999; MAGGI et al., 2013).

A respeito da transmissão da *A. platys* o que existe de evidência científica, é a detecção de DNA deste agente no carrapato *R. sanguineus* (s.l.) sendo incriminado como possível vetor biológico com relato em vários países (SIMPSON et al., 1991; SARANAGO et al., 2003; RAMOS et al., 2014)

Já é conhecido da comunidade científica que, em se tratando de artrópode hematófagos, a detecção de DNA viral ou bacteriano em seu corpo ou excreções corporais não é indicativo de potencial de vetoração competente, sendo necessário a presença do agente etiológico em todas as gerações do artrópode vetor (larva, protoninfa, ninfa e adultos) para comprovação do verdadeiro vetor biológico, sendo necessário observação de transmissão transestadial, intraestadial ou transovariana, como em estudos de competência vetorial (MORAIS-FILHO et al., 2015 ; SOARES et al., 2018; EISEN, 2020)

As divergências de estudos a respeito de *R. sanguineus* (s.l.) ser o candidato a vetor biológico, reside no fato de estudos desenvolvidos em Granada, apresentem indícios de por muitas vezes serem diagnosticados em cães, com alta prevalência e ausência de outros vetores locais fornecendo evidências irrefutáveis de possível transmissão (YABSLEY et al., 2008).

Um estudo de investigação de transmissão foi mais além e detectou DNA de *A. platys* em ninfas de *Dermacentor auratus* que infestavam cães na Tailândia, porém não foi possível demonstrar o potencial de transmissão (PAROLA et al., 2003) visto que não foi realizado os protocolos experimentais para investigar e detectar DNA do agente nas próximas gerações

do carrapato e em hospedeiros vertebrados como nos estudos de competência vetorial (MORAES-FILHO et al., 2015; EISEN, 2020)

A respeito da capacidade vetorial e de transmissibilidade de *A platys* por *R. sanguineus* no último estudo experimental de que temos conhecimento não comprovou a transmissão do agente etiológico para os cães (SIMPSON et al., 1991). Diversos trabalhos ainda relatam a necessidade de mais estudos para investigar sobre competência vetorial de *R. sanguineus,* visto que muitos estudos detectam coinfecção de *A. platys* com *E. canis* com prevalência de infecção semelhantes não podendo descartar esse potencial de transmissão (MADIGAN et al. 2000; ALMEIDA et al., 2012; RAMOS et al., 2014)

Como cães são afetados por diversos ectoparasitos no ambiente urbano, e como o ciclo biológico de *A.platys* ainda apresenta lacunas e não está elucidado, sendo a avaliação de outros ectoparasitos necessário ser realizada. Um dos candidatos em potencial é a pulga *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) devido sua importância e relevância na medicina veterinária e saúde pública, devido a veiculação de diversos agentes infecciosos como: cestódeos, protozoários, vírus, bactérias e rickettsias aos animais e ao homem (VOBIS et al., 2003; RUST, 2005; PEREZ-OSÓRIO et al., 2008).

Um estudo epidemiológico importante, relacionado com a transmissão de *A platys* e diferentes vetores incriminados no estado do Paraná, foi o estudo que determinou a prevalência molecular de *A. platys* superior a *B. vogeli*, com ausência de *E. canis*, no período do inverno, com prevalência de *R. sanguineus* baixa e com prevalência de *A. cajennense* superior (RIBEIRO et al., 2017). Este achado reforça a participação de outro vetor artrópode envolvido na sua transmissão, sendo necessário estudos futuros para descartar ou confirmar a participação de *R. sanguineus* como vetor de *A. platys*.

Estudo realizado no Sul do Brasil, relata também a possibilidade de transmissão de *A. platys* por outros vetores diferentes dos carrapatos, visto que no período de inverno em que a prevalência de piolhos é maior e sobrepõem a prevalência de carrapatos e aumentam neste período a prevalência molecular de infecção por *A. platys* reforçando desta forma evidências da vetoração por outro piolho e outros ectoparasitas como piolhos *Heterodoxus*. (BROWN et al., 2005; RIBEIRO et al., 2017)

Novos estudos precisam ser conduzidos para que a evidência de transmissão seja comprovada por algum vetor artrópode. Diante disto as especulações continuam devido estudos que demonstram a competência vetorial de *R. sanguineus* sensu stricto já documentada, fornecendo inclusive as evidências de transmissão transovariana (vertical) e a

transmissão transestadial (horizontal) (SNELLGROVE et al., 2020)

Os vetores que podem estar envolvidos na transmissão de *A. platys* são carrapatos de diversas espécies como: *Dermacentor aratus* (PAROLA et al., 2003) *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes persulcatus* (KIM et al., 2006) além de piolhos de espécie *Heterodoxus springer* (BROWN et al., 2005), mosquitos da espécie *Anopheles sinensis* (WEN-PING et al., 2016) e pulgas *Pulex irritans* e *Ctenocephalides felis* (PEREZ-TANORA et al., 2019) entretanto até o momento sem comprovação da competência vetorial.

Alguns relatos de experiências na rotina da clínica médica de cães merecem destaque, visto que na estação de inverno, a prevalência de *A. platys* sobrepõe ao diagnóstico de *Ehrlichia* sp. pelo kit de triagem o Snap 4Dx Plus e as infestações por carrapato diminuem com casos de ehrlichiose próximo a zero além dos relatos de aumento de infestações por mosquitos. O mesmo aconteceu com alguns trabalhos no Sul do país. Esses dados ainda não publicados são de uma clínica veterinária na zona oeste do Rio de Janeiro. Uma análise descritiva desses dados é o próximo passo como estudo epidemiológico nesta região para corroborar os achados na rotina e os relatos de *A. platys* no inverno. (SILVA, Dados não publicados).

2.2.6 Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais

As alterações decorrentes da patogenia relacionada a anaplasmose causada por *A. platys* e outros hemoparasitos da família Anaplasmataceae são bem conhecidas pelo principal quadro de trombocitopenia recorrente. Entretanto, esse não é um sinal patognomônico (FERREIRA et al., 2008), porém muito comum em nossa rotina. Diante deste achado não podemos negligenciar estes casos que são passíveis de investigação para fechar o diagnóstico (GAUNT et al., 1990).

Há relatos na literatura de que há uma trombocitopenia transitória relacionada ao mínimo de plaquetas parasitadas que são sequestradas pelo baço e também com quadros de agregação plaquetária, causando o que chamamos de pseudotrombocitopenia, sendo esse quadro normalizado com o tempo e (HILBER et al., 1986) e a cronificação do quadro clínico manifestado pela enfermidade (WOODY; HOSKING, 1991)

As alterações clínicas e laboratoriais desta enfermidade são inespecíficas como: febre, anemia, depressão, anorexia, trombocitopenia, macroplaquetas, monocitose (DAGNONE et al., 2003; HARRUS et al., 1997; ANTOGNONI et al., 2014)

Outros sinais clínicos e alterações laboratoriais podem variar de acordo com outros

fatores como: idade do animal, imunocompetência, fases da doença, raça e susceptibilidade intrínseca. Podemos encontrar outras alterações como: fraqueza muscular, letargia, dispnéia, secreção mucóide, epífora purulenta, esplenomegalia, hiperqueratose em plano nasal (TROTTA et al., 2009; SAINZ et al., 1999).

As alterações patológicas graves que são registradas na literatura: hemorragia petequial e equimose grave, trombocitopenia severa chegando ao quadro de 20.000 plaquetas / ml com ou sem agregados plaquetários (GAUNT et al., 1990) havendo também alterações patológicas generalizadas incluindo linfonodomegalia, hiperplasia folicular no baço e linfonodos submandibulares, pré-escapulares, poplíteos, mesentéricos e alterações em medula óssea (TOMASI et al., 2014, BAKER et al., 1987)

A importância de investigação dos casos de anaplasmose se faz necessário, visto que as alterações clínicas e laboratoriais são importantes para um diagnóstico precoce desta enfermidade. Diante disto, somente após o trabalho de Tomasi et al., (2014) que encontraram *A. platys* parasitando plaquetas e suas células precursoras encontradas na medula óssea de cães jovens, sendo este achado uma resposta para explicar o porquê do decréscimo de plaquetas no sangue total, sendo uma especificidade parasitária desta bactéria que não havia sido relatado com a presença de mórulas nos megacariócitos em trabalho anterior (RUSSEL; GRINDEM, 2000).

Muitos pesquisadores da época já questionaram a respeito de enfatizar a trombocitopenia como o principal achado para diagnosticar a anaplasmose por *A. platys*, visto que este achado é habitual em diversas enfermidades como diagnóstico diferencial para: ehrlichiose (DAGNONE et al., 2003) doenças imunomediadas idiopáticas, enfermidades secundárias à utilização de drogas; neoplasias (hemangioma, hemangiossarcomas) doenças infecciosas (cinomose, leishmaniose, reação pós vacinal, microangiopatia (DUMLER et al., 1995, DUMLER et al., 2001, HARVEY et al., 2006, MELTER et al., 2007). Alguns casos podem se agravar com as coinfecções com outros microrganismos e também com casos não infecciosos como doenças metabólicas e neoplásicas que podem agudizar o quadro clínico e laboratorial podendo chegar a casos fatais (CASTRO et al., 2004; DANTAS- TORRES, 2008)

2.2.7 Diagnóstico

Na rotina da clínica médica de pequenos animais e de forma empírica, muitos profissionais fazem o diagnóstico laboratorial de hemoparasitose, de forma incompleta,

baseado somente no achado de trombocitopenia (MACIEIRA et al., 2005). Esses casos ainda acontecem com proprietários de baixa renda, onde o responsável pelo animal deseja fazer o tratamento baseado na experiência do médico veterinário clínico, porque apresenta restrições financeiras o que impede de realizar exames complementares para confirmação do diagnóstico. Além disso, ainda existem tutores que chegam já para consulta com o diagnóstico sugestivo baseado nos resultados de exames com trombocitopenia ou histórico da presença de carrapato já iniciado tratamento com doxiciclina (SILVA, 2022- Observação pessoal).

Os métodos mais utilizados em ordem crescente de importância são: exame direto de esfregaço sanguíneo para identificação de mórulas intraplaquetarias, detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta e detecção de DNA alvo pela reação de cadeia em polimerase (PCR) (FERREIRA et al., 2008).

Por muitos anos o exame direto para visualização de mórulas no interior de plaquetas foi utilizado para diagnóstico com sucesso na fase aguda, entretanto caiu em desuso devido a baixa sensibilidade apesar da especificidade alta (HARVEY et al., 1978; RAMOS et al., 2009).

Como já vimos, apesar de estar em desuso devido a sensibilidade baixa, mesmo assim ainda é utilizado até hoje com menor frequência, devido ao custo baixo e por já fazer parte da rotina em patologia clínica veterinária. Entretanto é desencorajado por alguns autores devido à baixa concordância com a PCR que é considerada mais precisa que a citologia, mesmo com o uso de capa leucocitária (RAMOS et al., 2009; FERREIRA et al., 2007), que em particular, não faz mais parte da rotina na clínica veterinária, visto que a maioria dos exames são solicitados como: hemograma completo com pesquisa de hemoparasitos sem capa leucocitária (SILVA, 2022 - observação pessoal)

Até o momento, para o diagnóstico imunológico temos disponível no mercado brasileiro e internacional, o kit de diagnóstico qualitativo rápido (SNAP 4Dx Plus IDEXX Laboratories), que utiliza proteína *p*44 de *A. phagocytophilum* como antígeno além de proteínas *p*30 se *p*30-31 referente a *E. canis* para detectar anticorpos das classes de IgM e IgG para detecção pós infecção a partir de 8 dias, mesmo com a reação cruzada que pode existir (GREENE, 2006; BARR, 2009; BREITSCHWERDT, 2013), mesmo assim é considerado um bom teste para diagnóstico, visto que diferencia os agentes envolvidos que não podem ser diferenciados pelo exame direto de esfregaço além de oferecer um diagnóstico sorológico nos casos em que nunca foram utilizados teste de diagnóstico

imunológico para o animal acometido.

O diagnóstico assertivo desta hemoparasitose, assim como todo estudo para diagnóstico definitivo de uma enfermidade seja ela parasitária como infecciosa também, recomenda-se pelo menos a utilização de dois testes de diagnóstico na triagem para evitar os resultados falso negativos na PCR e os falsos positivos na sorologia (LASTA et al., 2013).

Apesar das inovações no diagnóstico molecular, em especial a PCR ao longo dos anos sofreu modificações devido às particularidades dos agentes parasitários envolvidos além das interferências intrínsecas a cada agente etiológico estudado. As modificações das técnicas de diagnóstico molecular são adaptações referentes aos genes alvos principalmente para detectar carga parasitária reduzida ao longo do curso da doença ou para detecção do agente na fase subclínica (GASSER, 1999). Essas adaptações refletem o avanço de grande impacto permitindo a diferenciação de táxons e mudança na nomenclatura de espécies dentro da mesma família, isolamento de genes expressos, detecção de genes resistentes a drogas, além de estudos de genotipagem e fenotipagem além de análises filogenéticas (GASSER, 1999; DUMLER et al., 2001)

Diante das técnicas de biologia molecular, a *q*PCR Real time é uma metodologia qualitativa, adaptação ou modificação da PCR convencional que amplifica o DNA em tempo real permitindo quantificar o material genético da amostra inicialmente, utilizando a fluorescência (SyBrGreen; Sonda TaqMan). Esta técnica possui alta precisão e rapidez reduzindo o risco de contaminação pois não há contato externo com as amostras após a reação. Como vantagem temos a detecção de mutações ou variações genéticas. Porém uma desvantagem é o ensaio baseado em polinucleotídeo p44 da proteína de superfície de membrana, sendo um fragmento variável oferecendo uma precisão duvidosa para o diagnóstico de hemoparasitos (LIN et al., 2003; GAUNT et al., 2020)

A *n*PCR Real time ou *nested*PCR é uma metodologia qualitativa sendo uma adaptação também da PCR convencional e envolve duas reações de PCR em rodadas sucessivas. A primeira PCR amplifica uma região maior do DNA alvo e a segunda PCR usa o produto da primeira reação como moldes e pares de primers internos. A segunda amplificação aumenta a sensibilidade e especificidade pois reduz os falsos positivos e detecta quantidades pequenas de DNA. Essa metodologia é utilizada para detectar patógenos com baixa carga parasitária em fase inicial de infecção. Esta técnica reduz a amplificação de DNA não específico e como desvantagem ela é mais onerosa, mais tempo, maior risco de contaminação cruzada entre as etapas e não é usada para quantificação o que prejudica casos que necessitam de valor de

carga parasitária (YAP et al., 1994; PUSTERLA et al., 1999; MARTINS et al., 2005; ABARCA et al., 2007)

Um estudo experimental com amostra de tecidos linfóides como baço e medula óssea foi realizado com objetivo de investigar os casos falsos negativos da PCR para *A, platys* em amostras de sangue total na fase aguda, e como resultado foi observado positividade para todos os tecidos que foram submetidos a técnica de qPCR. (EDDLESTONE et al., 2007)

Para o diagnóstico molecular em especial os hemoparasitos em geral, é necessário o conhecimento do ciclo biológico e o comportamento do agente infeccioso no sistema biológico do hospedeiro, visto que muitos casos falsos negativos ocorrem devido o sequestro do material genético para o sistema mononuclear fagocitário (SMF) localizados nos principais orgãos parenquimatosos como baço, fígado, linfonodos e a medula óssea. Em particular na anaplasmose por *A. platys*, as plaquetas parasitadas são sequestradas para o baço realizando a hemocaterese (EDDLESTONE et al., 2007)

É válido lembrar que *A. platys* pertence a um grupo de organismos rickettsiais que não são cultiváveis, diferente de ehrlichias que tem seu crescimento consolidado em cultura de células BHD2 (ANDERSON et al., 1991)

Diante das particularidades de cada técnica associada com preparo das amostras para a reação, isolamento, preparo e purificação do ácido nucleico além das precauções para evitar contaminação novos estudos foram desenvolvidos usando outros alvos como genes 16S rDNA, gltA, GroEL como um dos objetivos para evitar os falsos negativos (GASSER, 1999; YAP et al., 1994, INOKUMA et al., 2002; HUA et al., 2000; RAMOS et al., 2014, FERREIRA et al., 2007; OTRANTO et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2013).

2.2.8 Tratamento

O estudo inicial do tratamento da anaplasmose em cães se deu no mesmo ano da sua descoberta como micro-organismo intracelular pela primeira vez parasitando plaquetas de cães na Flórida. Inicialmente foi nomeado como *Ehrlichia platys*. Foi demonstrado a sensibilidade desta bactéria ao cloridrato de tetraciclina via oral aos cães com diagnósitco direto pelo método de esfregaço sanguíneo (HARVEY et al., 1978). Esse tratamento foi utilizado por muitos anos com sucesso, até que os pesquisadores perceberam a rescidiva da infecção com o surgiemnto de novas mórulas no esfregaço com a interrupção do tratamento (FRENCH; HARVEY, 1984).

No mesmo trabalho realizado por French e Harvey (1984) a oxitetraciclina foi utilizada

como droga para comparação entre as tertraciclinas de 1ª geração e foi observado o mesmo resultado com o ressurgimento de móulas no sangue periférico, levando a conclusão de sua ineficácia em protocolos curtos ou suspensão precoce do tratamento.

No final da década de 90, no mesmo período em que pesquisadores estudavam novas terapias para ehrlichia além das tetraciclinas de 1ª geração (BREITSCHWERDT et al., 1998), Baker et al. (1997) publicaram seus resultados com estudo clínico e experimental demonstrando que a tetraciclina de 2ª geração, a doxiciclina era capaz de ultrapassar a membrana dos megacariócitos dentro da medula óssea e plaquetas comprovando a eficácia absoluta no tratamento. O mesmo foi comprovado e ratificado em estudos com ehrlichia (PRICE et al., 1975; BREITSCHWERDT et al., 1998).

Com a evolução no diagnóstico de bilogia molecular, o monitoramento da prevalência destas infecções diante do tratamento proposto, tornou o estudo clínico mais eficaz, visto que o diagnóstico de coinfecções aumentou sua frequência com o entendimento do porquê de casos clínicos mais graves (BEALL et al., 2005). A biologia molecular com a utilização da PCR, não somente como ferrramenta para estudos epidemiológicos, passou a desempenhar um papel muito além de diagnóstico e diferença entre micro-organismos (RAMOS et al., 2009), tornou-se capaz de monitorar eficácia de tratamento e até seleção de dorgas refratárias no tratamento de ehrlichia até o momento (DINIZ; DE AGUIAR, 2022).

Os trabalhos mais recentes e de impacto na medicina veterinária a respeito das hemoparasitoses, referem-se ao tratamento de doenças transmitidas por carrapatos com enfoque em bactérias. O primeiro representa um dos documentos mais importantes, publicado pelo College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), que estabelece as diretrizes mundiais oficiais para o tratamento das doenças transmitidas por carrapatos em cães. Este consenso chancelou e estendeu o uso da doxiciclina (10 mg/kg, a cada 12 ou 24 horas) pelo período mínimo de 28 dias para garantir a eliminação tecidual total (SAINZ et al., 2015)

O segundo trabalho é uma revisão internacional liderada por pesquisadores brasileiros e contempla atualizações globais sobre os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. O trabalho consolidou os protocolos terapêuticos mais modernos e validou o uso da minociclina como a principal alternativa farmacológica e de segunda linha para pacientes que apresentam intolerância gastrointestinal severa ou refratariedade à doxiciclina. Além disso identificou, mapeou e classificou as cepas quanto a sua patogenicidade e gravidade (DINIZ; De AGUIAR, 2022).

2.3 *Babesia vogeli* (Piana & Galli-Valerio, 1937) Reichenow (1937)

2.3.1. Histórico da Babesiose canina

A descoberta do gênero *Babesia* spp. aconteceu na época em que o continente europeu no período de 1887 e 1890 enfrentou uma grande epidemia que atingia o delta do Rio Danúbio causada pela peste bovina. Um século depois, entre os anos de 1986 e 1989 o Quênia sofria com este surto que começou a se espalhar pela África Oriental (WAMWAYI et al., 1992).

Os pesquisadores na época que faziam parte do grupo de médicos e microbiologistas chefiados por Victor Babes procuravam encontrar o agente etiológico que seria responsável pelo surto que acometia os bovinos do Delta do Rio Danúbio, visto que os sinais se assemelhavam com o da peste bovina. Mas foi em 1888, que Victor Babes foi o primeiro a descrever o gênero Babesia spp. (BABES, 1888; Apud UILENBERG, 2006)

Neste período, muitos pesquisadores estavam com divergências nas descobertas, visto que a enfermidade hemoglobinúria enzoótica estava sendo relatada como uma enfermidade desde a antiguidade no Egito. Diante deste fato, a infecção por *Babesia* pode ter sido a primeira referência histórica na Bíblia no livro de Êxodo no capítulo 7, versículo 14 onde se relata a peste do gado egípcio do Faraó Ramses II que ficou conhecida na época como a febre da água vermelha dos bovinos em que na Bíblia é relatada como a primeira praga do Egito, em que a água vira sangue (HOMER et al., 2000).

Em 1888, Victor Babes, reconheceu primeiramente a Babesia como *Haematococcus bovis*, visto que apresentava as mesmas características morfológicas, de coloração ao microscópio óptico por parasitar hemácias exclusivamente causar hematúria, hemoglobinúria e outros achados clínicos e anatomopatológicos, como aos da enfermidade hemoglobinuria enzoótica (BABES, 1888; Apud, HOMER et al., 2000).

Em 1893, Starcovici, pesquisador do grupo de Victor Babes, reavaliou o agente etiológico em questão, visto que além das contradições, especulações entre os pesquisadores da época em suspeitar de uma virose endêmica, a peste bovina, após sua revisão, denominou-o em *B. bovis* em homenagem ao seu mestre (BABES, 1888; Apud, HOMER et al., 2000).

Ainda em 1893, Smith & Kilborne, estudaram a febre do Texas em bovinos no Sul dos EUA e esse trabalho foi um marco na história natural da transmissão da *Babesia* entre

hospedeiros vertebrados. Esse trabalho pela primeira vez associa o carrapato como vetor biológico na transmissão da *Babesia* sendo hoje considerado uma referência para estudos experimentais de infecção envolvendo artrópodes e vertebrados para estudos de diversos patógenos, enfatizando estudos experimentais de infecção por piroplasmideos.

À medida que os trabalhos eram publicados e a descoberta da participação de artrópodes no ciclo biológico da *Babesia*, muitos pesquisadores começaram a publicar o registro de novas espécies e seus respectivos hospedeiros e vetores. Como exemplo tem o caso da primeira descrição de *B. canis* por Pianna-Galli Valério em 1895 na Itália. A partir dessa descrição a nova espécie de Babesia em cães passou a ser relatada em vários países da Europa, Ásia, África, América do Norte e América do Sul (RISTIC, 1988).

Nas décadas seguintes, novas espécies foram registradas como *Babesia gibsoni* com variação nos sinais clínicos com base nas diferenças encontradas nos carrapatos vetores, na morfologia de grandes e pequenas babesias e nas regiões geográficas como Europa, África, África subsaariana e Ásia. (UILENBERG et al. 1989).

Os mesmos autores continuaram os estudos selecionando duas linhagens de Babesia (grande babesia) provenientes de cães da França e transmitidos por *Dermacentor reticulatus*, duas linhagens do norte da África, tendo como vetor *R. sanguineus* e uma linhagem da África do Sul transmitidas por *Haemaphysalis leachi*. Foram feitas comparações como teste de imunidade cruzada em cães e teste de imunofluorescência indireta (IFI). Como desfecho dos estudos, Uilenberg et al. (1989) propuseram a utilização de um sistema trinominal para nomenclatura de três grupos distintos para *Babesia canis* com três subespécies e seus respectivos vetores: *B. canis canis* tendo como vetor biológico *Dermacentor reticulatus*, B. *canis vogeli*, como vetor *R. sanguineus* e *B. canis rossi*, como vetor *Haemaphysalis leachi*.

Penzhom (2020) relata em sua revisão a importância de busca por literatura com cautela para o estudo da babesiose em cães, visto que, no período entre 1895 e 1938 foi demonstrado que *B. canis* foi referenciada como agente etiologico, porém se tratava de 3 espécies distintas assim como seus vetores e regiões fisiográficas. O mesmo ocorreu entre o período 1940 e 1989 com os artigos de clínica, terapêutica e profilaxia. Entretanto o autor relata que relatórios clinicos da Europa podem ser atribuídos com segurança para *B. canis*, assim como relatórios para África podem ser atribuídos para *B. rossi* e outras áreas ao redor do mundo, podem ser atribuídas a *B. vogeli* sem risco de atribuir ao outro agente piroplasmideo envolvido.

2.3.2 Posição Taxonômica

Segundo O'Dwyer & Massard (2002) o gênero Babesia pertence:

Filo MIOZOA Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo APICOMPLEXA Lewine, 1970

Classe COCCIDIOMORTHEA Doflein, 1901

Ordem PIROPLASMORIDA Wenyon, 1962

Família BABESIIDAE Poche, 1913

Gênero *Babesia* Starcovici, 1893

Espécie *Babesia vogeli*, (Piana & Galli-Valerio, 1895) Reichenow, 1937

Desde a descrição do gênero Babesia e posteriormente a descoberta de novas espécies sendo as primeiras *B. bovis, B. canis* e outras babesias, o conceito de nomenclatura zoológica para a correta descrição taxonômica, era baseada na morfologia intraeritrocitária, como o formato amebóide ou piriforme grande ou pequeno, formação de cruz de malta, especificidades dos hospedeiros como cães domésticos para *B. canis* e microscopia óptica. Além dos critérios biológicos como morfologia, coloração na hematoscopia e ciclo biológico nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. (UILENBERG, 1989; UILENBERG, 2006; HOMER, 2020).

Com a evolução dos estudos de biologia molecular novos critérios foram introduzidos como: estudo e análise dos genes em cada genoma, características fenotípicas e genotípicas de diversos micro-organismos identificando as mudanças de gênero e espécies dentro da mesma família, sendo o exemplo mais evidente de que temos conhecimento, são as mudanças na nomenclatura de gêneros e espécies dentro da família Anaplasmataceae e a nomenclatura trinominal das subespécies de Babesia que mudaram para binominal nas espécies de Babesia em cães (UILENBERG, 1989; UILENBERG, 2006; DUMLER et al., 2001).

2.3.3 Ciclo biológico e formas de transmissão

Como a maioria dos artrópodes ectoparasitos são conhecidos como vetores biológicos ou mecânicos de patógenos, com algumas exceções o gênero *Babesia*, em especial *B. vogeli* possui como vetor biológico o carrapato da família Ixodidae, sendo o *R. sanguineus* o principal vetor ainda conhecido. (LEVINE, 1971; MAHONEY, 1977).

A estratégia para evolução e perpetuação da espécie em *B. vogeli*, foi utilizar a infecção por meio da alimentação do carrapato vetor no momento da inoculação de saliva

contendo os esporozoítos infectantes. (HOMER, 2000; VIDOTTO; TRAP, 2004; UILEMBERG, 2006).

Como todo membro do Filo Apicomplexa, a *Babesia* spp. por meio do seu complexo apical realiza invasão nos ácinos das glândulas salivares do carrapato antes do repasto sanguíneo, onde já ocorre a fase esporogônica chegando a produzir milhares de esporozoítos infectantes antes da inoculação nos hospedeiros. Os esporozoítos são a forma infectante que será liberada com a saliva do carrapato durante sua alimentação. A carga parasitária estimada, de esporozoítos em cada glândula salivar é de 5 a 10 mil esporozoítos (HOMER et al., 2000).

Ao penetrar nos eritrócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos ameboides ou piriformes que se multiplicam em fissão binária dando origem ao merozoítos que vão iniciar de merogonia. A intensa multiplicação nos eritrócitos se rompem e liberam os merozoítos que tornam a invadir outros eritrócitos, aumentando o volume e se transformando em gamontes (UILENBERG, 2000).

O sangue dos hospedeiros ingerido pelo carrapato contendo os merozoitos são digeridos pelo intestino aqueles que não se diferenciam em gamontes. Enquanto os que se desenvolveram em gamontes penetram no intestino e dão origem ao cineto de aspecto radiado (KOCH, 1906). Com a fusão destas formas surge o zigoto móvel que vai dar origem o oocineto, que se multiplica e deixa a célula intestinal e cai na hemocele, invadindo vários órgãos do carrapato dando origem a vários esporocinetos que invadem os ovários, infectando os ovos e transmitindo a infecção para a próxima geração, sendo chamada esse tipo de transmissão transovariana (UILEMBERG, 2000).

Uma importante característica no ciclo biológico da *Babesia* é a transmissão transovariana, visto que permite a manutenção da parasitemia no carrapato por várias gerações, enquanto o carrapato se alimenta em diversos hospedeiros vertebrados, não perdendo sua infectividade. Com essa particularidade o carrapato é capaz de transmitir a *Babesia* para cães, mesmo após se alimentar por 5 gerações no ouriço como um bom exemplo já registrado (SHORT, 1973; SOULSBY, 1987; CHAUVIN et al., 2009)

Na babesiose também ocorre a transmissão transestadial, visto que a manutenção e persistência da infecção no carrapato são possíveis por dois tipos de estratégias, a transmissão transovariana já relatada e a transestadial. Esta por sua vez permite a perpetuação da babesia no carrapato, sendo sua bacteremia mantida na hemocele até que a próxima geração esteja pronta para realizar o repasto sanguíneo em outro ou no mesmo

hospedeiro. Antes mesmo de iniciar a infecção os esporozoítos antes de serem liberados com a saliva do carrapato apresentam uma carga parasitária estimada já pronta na glândula salivar de até 10 mil esporozoítos (HOMER et al., 2000), sendo que o carrapato só se torna infectante após fixação no hospedeiro (VIDOTO; TRAPP, 2004).

Pesquisadores no Brasil que estudam sazonalidade, ecologia e biologia parasitária de *R. sanguineus* (s.l.) e transmissão de agentes patogênicos por artrópodes, relatam infecção por *B. vogeli* associada a altas infestações por carrapato durante todas as estações do ano, realizando quatro gerações /ano, revelando condições favoráveis para o desenvolvimento deste vetor associado a perpetuação da *B. vogeli* em cães também o ano inteiro, com algumas exceções. (LOULY, 2003; VIDOTTO; TRAPP, 2004; LABRUNA, 2004)

2.3.4. Aspectos epidemiológicos

As espécies de babesia que acometem os cães ao redor do mundo estão intimamente ligadas aos seus vetores invertebrados, visto que a distribuição geográfica das diferentes cepas está intimamente ligada a competência vetorial restrita em algumas regiões do país, como ocorre com os vetores de *Ehrlichia* spp, *Borrelia* spp *e Rangellia* spp respectivamente (BAHIENSE et al., 2020; EISEN, 2020; SOARES et al., 2018; FOURNIER et al., 2020).

Como a ampla distribuição das prevalências pode variar nas regiões tropicais e subtropicais (TABOADA, 1992), podemos encontrar outras espécies mais patogênicas como *B. rossi* especificamente na África e outras babesias como *B. canis* e *B. vogeli* conhecida como grande babesia (2,5 - 5,0 µm) na Ásia, Austrália, Europa e nas Américas. (MARTINOD et al., 1986; UILENBERG et al., 1989). Entretanto *B. gibsoni*, conhecida como pequena babesia (1,0 - 2,5 µm) pode ser encontrada na África, América do Norte e Ásia (LOBETTI, 1998), Europa (CONRAD et al., 1991; BIRKENHEUER et al., 1999) e no Sul do Brasil (TRAPP, 2006).

Durante muito tempo, de acordo com as classificações já mencionadas, pequenas e grandes babesias, acreditava-se que as únicas espécies causadoras de babesiose em cães ao redor do mundo, eram *B. canis* e *B. gibsoni* (BOOZER e MACINTIRE, 2003).

Entretanto, outras variáveis intrínsecas ao agente etiológico como propriedades antigênicas e especificidades de diferentes vetores além de variáveis extrínsecas como distribuição geográfica, foram importantes para levantar a hipótese da existência de uma linhagem geneticamente distinta dentro do complexo *B. canis* sendo proposto a sua divisão

em três subespécies (UILENBERG et al., 1989; HAUSCHILD et al., 1995).

Estudos anteriores de biologia molecular foram o diferencial para comporvar e confirmar as especulações que até então sugeriam diferenças que iam além da morfologia das babesias. Logo baseado em distribuição geográfica, diferentes carrapatos vetores, propriedades antigênicas e principalmente a patogenicidade, que é uma variável importante para sugerir diferenças entre espécies, com uma visão em clínica médica, foi demonstrado que existem diferenças entre as babesia por todo o mundo (REICHENOW, 1935; UILENBERG et al., 1989; LEWIS et al., 1996; SCHETTERS et al., 1997).

O trabalho de Uilenberg et al. (1989) foi um marco importante na época visto que de acordo com a variável patogenicidade e diferentes vetores invertebrados foi possível comprovar as diferenças a nível molecular porpondo um sistema trinominal de nomenclatura para diferenciar as 3 subespécies de *B. canis* a nível taxonômico selecionando-as em diferentes continentes : *B. c. canis* transmitida pelo *Dermacentor reticulatus* na Europa, *B. c. vogeli*, transmitida por *R. sanguineus* (s.l.) no Norte do Sul da África, nas Américas, Ásia, Austrália e Europa e *B. c. rossi* a mais patogênica *Haemaphysalis leachi* na África do Sul. No Brasil a *B. c. vogeli* é a principal subespécie que acomete os cães (VIDOTTO; TRAPP, 2004; JOJIMA et al., 2008) porém já foi isolada *B. gibsoni* no Brasil (TRAPP et al., 2006).

Nos anos seguintes à publicação de Uilenberg et al. (1989), foi observado a transição gradual com mudança na nomenclatura baseado na epidemiologia molecular e principalmente na filogenia molecular através do sequenciamento do gene 18S rRNA, com a publicação sequencial de alguns autores (ZAHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999).

Nos anos seguintes novos estudos baseados em genotipagem confirmaram a existência de 3 espécies distintas com a nomenclatura trinominal sendo eliminada visto que as subespécies anteriormente denominadas apresentaram divergência genética e agora foram denominadas de *B. canis, B. vogeli* e *B. rossi* (UILENBERG, 2006; IRWIN, 2009; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011). No mesmo período, os estudos de genotipagem permitiram a caracterização de novas espécies pertencentes aos gêneros *Babesia* e *Theileria* que infectam cães (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011).

Com o advento dos estudos de biologia molecular e a respeito da nova classificação taxonômica de grandes babesias, de certa forma impulsionaram os estudos de outras espécies de pequenas babesias em cães. Alguns postulados tomados como verdade, a respeito de pequenas babesias direcionam o conhecimento de que os cães sejam afetados somente pela espécie *B. gibsoni* (CACCIO et al., 2002).

Os estudos realizados no período compreendido entre o final da década de 1990 e meados de 2000, incluindo os estudos de Caccio et al. (2002) demonstraram que existem inúmeras espécies de "pequenas babesias" em cães e nem todas são *B. gibsoni*.

Os novos estudos de *Babesia*, tem sido observado também a utilização de análises filogenéticas do gene 18S rRNA e da mesma forma com *B. canis* foi encontrado também para *B. gibsoni* pelo menos três espécies distintas: um isolado da Ásia, outro da Califórnia e o terceiro da Europa. O isolado asiático é o organismo original encontrado na Índia, sendo considerado *B. gibsoni* sensu stricto (ss) (PATTON, 1910; TRAPP et al., 2006). O isolado da Califórnia é uma espécie diferente com algumas características do gênero *Theileria*, sendo o nome *B. conradae* proposto para este isolado (KJEMTRUP et al., 2000) O isolado da Europa é uma *Theileria* com parentesco próximo a *B. microti* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) que foi nomeada *Theileria annae* (CAMACHO et al., 2001).

Alguns trabalhos demonstraram a infecção de cães por outras espécies pequenas de piroplasmídeos como *T. equi* (FORNELIO et al., 2004; FRITZ, 2010*)* e *B. microti*-like (ZAHLER et al., 2000). Um trabalho realizado na Arábia Saudita que mostra a mesma espécie de *T. equi* em cães de clínicas veterinárias e de cães que vivem afastados da cidade e desta clinica veterinária em contato com equinos mostrando a permuta de agentes patogênicos transmitidos por carrapatos entre diferentes espécies com ausência de contato entre os cães das diferentes localidades (SALIM et al., 2019).

2.3.5. Hospedeiros vertebrados e vetores

No estudo da transmissão de hemoparasitos, em particular *B. vogeli,* os hospedeiros vertebrados e invertebrados apresentam características especificas de cada espécie para que haja a transmissão do agente patogênico e sua perpetuação. Nesse contexto, o estudo da competência vetorial, abre caminhos para o conhecimento de novas espécies de hospedeiros e vetores competentes para o sucesso da transmissão. (BAJER; DWUZNIK-SZAREK, 2021; MARTINEZ-GARCIA et al., 2021).

Já é de conhecimento na literatura, ao longo desses anos, que o cão é o principal hospedeiro vertebrado da *B. vogeli* no ambiente urbano e rural. Vários autores já relataram que a diversidade de ambientes que o cão doméstico tem acesso, faz com que ele seja responsável pela permuta de diferentes patógenos entre diversos ambientes (MASSARD et al., 1981; LABRUNA et al., 2000; SZABÓ et al., 2013; LUZ et al., 2014) permitindo que este protozoário adaptasse seu ciclo de vida aos diferentes vetores, assim como acontece com o

Hepatozoon canis (GIANNELLI et al., 2013).

A babesiose é prevalente em ambiente rural, urbano e silvestre com a participação de *R. sanguineus* (s.l.) sendo seu principal vetor nesses ambientes (O'DWYER et al., 2001, 2009). Entretanto, alguns trabalhos relatam a participação de diferentes vetores já encontrados para diversas espécies de babesia ao redor do mundo que afetam canídeos como *B. vogeli, B. canis, B gibsoni* e *B rossi* respectivamente. (BAJER; DWUZNIK-SZAREK, 2021).

Um estudo realizado por pesquisadores do México relata duas espécies de babesia *B. vogeli* e *B. gibsoni* que foram isoladas via PCR dos mesmos vetores em comum (*Haemaphysalis* spp.; *R. sanguineus* e *R. turanicus*) e hospedeiros vertebrados todos cães. No mesmo estudo *Ixodes ricinus* foi encontrado como possível vetor para *B. gibsoni* e *B. venatorum.* Outros vetores isolados foram encontrados como *R. haemaphysaloides* para *B. vogeli* e *Ixodes persulcatus* para *B. venatorum* (MARTINEZ-GARCIA et al., 2021)

Babesia vogeli tem sua distribuição geográfica global (África, Ásia, Austrália, América, Europa) sendo encontrada em 95,7 % de *R. sanguineus* como seu vetor principal (HARRUS et al., 2011) e 4,3% *H. longicornis* como vetor em menor percentual (BAJER; DWUZNIK-SZAREK, 2021). Foi encontrado também DNA de *B. vogeli* em *R. turanicus em* Israel (HARRUS et al. 2011).

Babesia canis tem sua distribuição geográfica restrita a Europa e Asia segundo alguns estudos apresentando seu maior percentual de detecção do seu DNA em 80 % de *Dermacentor reticulatus* (HODŽIĆ et al. 2017) e 15% *Ixodes ricinus* (MARTINEZ-GARCIA et al., 2021; BAJER; DWUZNIK-SZAREK, 2021).

Babesia gibsoni também tem sua distribuição geográfica global (África, Ásia, Austrália, América e Europa) sendo encontrado seu DNA em 91 % de cães que participaram de brigas sendo que 93% foram cães da raça American Pitt Bull Terrier (BIRKENHEUER et al., 2005). No sul do Brasil, há relatos ainda questionáveis para alguns autores, da ocorrência de *B. gibsoni* na população de *R. sanguineus* (VIDOTTO; TRAPP, 2004, LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES et al., 2004), que é considerado também o seu principal vetor competente. A literatura ainda relata dois vetores de *B. gibsoni* os carrapatos *H. longicornis* e *H. bispinosa* (GROVES, DENNIS, 1972; OTSUKA, 1974) respectivamente, até que tenhamos conhecimento, ainda não foram identificados no Brasil (UILEMBERG et al., 1989; LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Babesia rossi apresenta sua distribuição geográfica restrita a África do Sul, sendo observado a presença de seu DNA em 72,7% de *H. parva* (ORKUN et al.) e 27,3% *H. leachi*

(BAJER; DWUZNIK-SZAREK, 2021).

Outra forma de transmissão que podemos denominar são fômites e o histórico de brigas que se deu pelo contato do sangue entre animais sadios e infectados. Neste grupo temos maior incidência de *B. gibsoni* em contraposição ao grupo de animais que não participaram de brigas (MATSUU et al., 2004; BIRKENHEUER et al., 2005).

Em canídeos silvestres do sul do Brasil, após análise prévia de esfregaços sanguíneos, foi observado *Babesia* spp. Os autores sugeriram que a transmissão nesses animais se deu pela infestação efetuada pelos carrapatos do gênero *Amblyomma* spp., visto que somente este ixodídeo foi encontrado nos animais em estudo. Entretanto não podemos afirmar que pela ausência de outro vetor, *Alblyomma* spp. seja responsável pela transmissão (RUAS et al., 2002).

As babesias são protozoários com ciclo digênico, em que nos hospedeiros invertebrados que são da família Ixodidae, há o ciclo sexuado, e o hospedeiro vertebrado é mamífero, sendo rara a participação do ser humano. Para as espécies de que se conhece o ciclo vital, são descritos como carrapatos vetores os gêneros: *Amblyomma, Anocentor, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Ixodes* e *Rhipicephalus* (KREIER, 1994).

Na pesquisa para diagnóstico de hemoparasitos e seus vetores, O'Dwyer (2000) encontrou pelo método de esfregaço sanguíneo, 5,2% de *B. canis* e 4,8% de *E. canis*. As espécies de carrapato encontradas foram: *A. cajannense* (23,6%) (Atualmente *A. sculptum), R. sanguineus* (12,4%), *A. aureolatum* (2,8%) e *A. ovale* (2%).

Há procura de novos hospedeiros para *Babesia* spp. em hospedeiros silvestres, pesquisadores relatam pela primeira vez no Brasil, a ocorrência de babesiose em roedores e alguns aspectos epidemiológicos em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. Foi encontrado a prevalência de 27,3% de *Babesia* spp., em destaque *Rattus novergicus* como hospedeiro principal com 50% de positividade, apontado como o principal reservatório de *Babesia* spp. entre as espécies de roedores comensais nesta região (GAZETA et al., 2004)

Um caso de babesiose humana foi relatado no Rio de Janeiro em uma paciente idosa de 83 anos, que mantinha contato direto com equinos e caprinos com grande risco de exposição a carrapatos. Após sucessivas tentativas de tratamento com quimioterapia antineoplásica e tratamento empírico para tuberculose na Fundação Oswaldo Cruz, foi somente após análise de um mielograma por um médico veterinário que foi observado parasitismo de 40% sendo identificado como agente etiológico *B. microti* (SERRA-FREIRE, 2014).

2.3.6. Patogenia, alterações clínicas e laboratoriais

As alterações clínicas e a patogenia das diferentes cepas de *Babeisa* spp. estão intimamente ligadas com a espécie envolvida com a infecção, a imunidade e a idade do hospedeiro. Já sabemos que a cepa de *B. vogeli* que acomete cães no Brasil é a menos patogênica com casos esporádicos de gravidade que está ligada com a cronicidade da doença e o tempo em que animal passou em estado subclinico. A diferença entre elas baseia-se na especificidade do vetor, nível de patogenicidade, ausência de reações cruzadas além de gradativamente está sendo elucidado com o auxílio de novas técnicas moleculares de genotipagem e filogenia além de investigação clínica meticulosa (MARTINOD et al., 1986; UILENBERG, 2006; IRWIN, 2009; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011)

Espécies de *Babesia* não podem ser distinguidas por exame direto de esfregaço sanguineo, visto que são morfologicamente idênticas a outros piroplasmideos como *Rangelia vitallii* e *Theilleria* spp. que causam alterações clinicas semelhantes e grau de patogenicidades diferentes e são transmitidas por diferentes carrapatos vetores (LEMOS et al., 2017; SALIM et al., 2019)

A transmissão não vetorial por transfusão de sangue acontece de cão para cão e representa uma importante variável epidemiológica e pode ser responsável pela disseminação da infecção para áreas não endêmicas. O relato de cães envolvidos em brigas com um percentual muito alto intimamente relacionado com a cepa de *B. gibsoni* é uma variável importante a ser considerada também (BIRKENHEUER et al., 2005). O diagnóstico preciso e o conhecimento das diferentes espécies de *Babesia* spp. são importantes para a seleção da terapia correta, visto que a *B. rossi* é a mais temida devido sua gravidade e para acompanhar os estudos epidemiológicas relacionadas à infecção por diferentes espécies globalmente (SOLANO- GALLEGO; BANETH, 2011).

As infecções humanas por espécies de *Babesia* sp que infectam cães e gatos não são relatadas aqui no Brasil, entretanto nos EUA é causada pela *B. microti*, transmitida por picadas de carrapatos da espécie *Ixodes scapularis,* nos estados do Nordeste e do meio-Oeste (SWANSON et al., 2023). No Canadá, *Babesia duncani* foi responsável pela infecção em mais de mil pessoas na região da Costa do Pacífico (SCOTH; SCOTH, 2018). Entretanto, cães e gatos estão cada vez, mas próximos de pessoas convivendo e dividindo o mesmo espaço físico, aumentando o risco de exposição de humanos aos vetores e servem como fonte de carrapatos infectados funcionando como sentinelas para a disseminação da

doença para humanos (L'EMPEREUR et al., 2011).

As espécies *B. canis* e *B. vogeli* possuem de moderada a baixa patogenicidade respectivamente, com animais que apresentam infecção inaparente e branda. Casos de babesiose acontecem na clinica veterinária e levantam suspeita após tratamento empírico para erliquiose e o cão continua apático e mantendo hematócrito abaixo de 25 -30% e quando faz sorologia dot ELISA IgM descobre um percentual subclinico que pode chegar a 90% (SILVA, 2022 – Dados não publicados). Desta forma encontramos o dignóstico de babesiose de baixa a branda potogenicidade. A forma aguda da babesiose é observada em infecções por *B. gibsoni* ou por *B. rossi*, sendo que esta última possui alta patogenicidade causando doença fulminante pelo aumento da parasitemia sendo a mais virulenta e restrita ao continente afriano, até o momento (SCHETTERS et al., 1997; UILENBERG et al., 1989).

Babesia vogeli, transmitida pelo *R. sanguineus* (s.l.) causa doença branda nos EUA e regiões tropicais e subtropicais como o Brasil (PASSOS et al., 2005) podendo se manifestar de forma subclínica, aguda, hiperaguda e crônica (ALMOSNY, 2002), sendo cães jovens mais sensíveis e apresentam frequentemente a forma mais grave da doença podendo levar a morte (ABDULLAHI et al., 1990).

O diagnóstico clínico é baseado na anamnese e sinais clínicos, visto que não existem sinais patognomônicos desta hemoparasitose, e sim uma infinidade de sinais e sintomas inespecíficos como: palidez de mucosa, taquipneia, taquicardia, febre, anemia hemolítica, icterícia, anorexia, letargia, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, hemoglobinúria, hematúria, (ABDULLAHI et al., 1990) além de ascite com presença de merozoíto piriforme na cavidade abdominal (GONDE et al., 2014; COTA et al., 2018).

Para o diagnóstico diferencial de sinais clínicos e sua relação com a babesiose por exemplo, é de suma importância o conhecimento de quais enfermidades podem cursar com os mesmos sinais. Um dos sinais clínicos como a rabdomiólise pode ocorrer em casos de babesiose sendo caracterizada clinicamente por dor muscular, tremores e pigmentúria (MALHERBE, 1996; JACOBSON; LOBETTI, 1996).

Assim como outras enfermidades que podem cursar com insuficiência renal aguda (IRA) ou insuficiência renal aguda (IRC) a babesiose menos comum pode levar a esse quadro, além da babesiose renal visto que pode funcionar como uma obstrução e entupimento dos capilares cerebrais podendo levar ao infarto cerebral devido grau de isquemia pela deficiência de aporte sanguieno nesta região. Há aumento da mioglobina sérica, enzimas musculares,

necrose muscular e hemorragia observada em necropsia (ELBAHNASAWY et al., 2011).

A patogenia e os quadros clínicos são inespecíficos e somente com o diagnóstico sorológico ou molecular e possível diferenciar um quadro gastrointestinal por exemplo que afeta a maioria dos órgãos que compõe esse sistema digestório como: pancreatite aguda, associada com anorexia, vômito, diarreia, melena, hematêmese, e derrame abdominal A taxa de mortalidade relatada é de 21% e pode estar associada com outras complicações ocorrendo frequentemente em cães com pancreatite aguda: icterícia clínica, anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) , babesiose cerebral e hemoconcentração (MOHR et al., 2000).

A babesiose cerebral é outra alteração clínica incomum de ocorrer, mas que vem apresentando casuística na clinica veterinária tendo como diagnóatico diferencial, cinomose, epilepsia e erliquiose (SILVA, 2022 - Observação pessoal). Existem casos também de filhotes que caem da escada ou de determinada altura após convulsão e no exame de sangue para investigação aparece meorozoíto pirifomre ou ameboide em exame direto de esfregaço sanguinieo (SILVA, 2022 - Observação pessoal)

Os casos de babesiose cerebral apresentam um prognóstico causado por dano endotelial com necrose microvascular, edema perivascular e hemorragia (JACOBSON, 2006). A doença tem início hiperagudo sendo caracterizada por "lama" de parasitas em eritrócitos de vasos cerebrais (JACOBSON; CLARK, 1994). A doença tem evolução aguda com relatado de cão tetraplégico em questão de horas depois de apresentar ataxia de membros posteriores; a maioria dos cachorros mostram sinais neurológicos, incluindo convulsões, alterações comportamentais, ataxia, paresia, nistagmo, anisocoria e movimentos de pedalagem com vocalização (JACOBSON; CLARK, 1994; MALHERBE, 1966).

2.3.7. Diagnóstico

O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos e laboratoriais, com observação de microscopia ópitica de merozoítos amebóides ou piriformes em esfregaço sanguíneo corados pelo Gimensa ou panótico, além de detecção de anticorpos por meio de métodos sorológicos e por técnicas de biologia molecular. O diagnóstico de *B. vogeli* realizado pela microscopia através do exame direto de esfregaço sanguíneo é rápido, de baixo custo e altamente específico, porém com baixa sensibilidade devido a parasitemia baixa ser muito frequente devido a fase subclínica da doença e o sequestro de merozoítos para baço e a destruição por hemocaterese. Além disso, podem ocorrer as lesões esplênicas associadas ao processo infeccioso, muito comum as esplenomegalias, que poderiam resultar em extravasamento de

sangue para a cavidade peritoneal justificando a presença do protozoário em forma intra e extracelular nesse espaço (VERCAMEN et al., 1995; TROTTA et al., 2009; COTA et a., 2018).

Os testes sorológicos utilizados na rotina são principalmente imunocromatocgráficos com papel de filtro com corrida unidirecional ou bidirecional de dupla lavagem no caso de ehrlichia. Entretanto tem suas limitações como Dot ELISA que pode ter reação cruazada pois são técnicas simples, sensíveis, entretanto diferenciar entre infecção atual e recente como exposição prévia sem estabelecimento de infecção, é um dos maiores problemas no diagnóstico definitivo desta enfermidade (RIKIHISA et al., 1994; WEN et al., 1997). Ainda podem apresentar falso positivos devido cicatriz sorológica em casos de doença aguda, além do animal poder permanecer soropositivo por vários períodos (ALMOSNY, 2002; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) sendo necessário associação com outros testes de diagnóstico (DUMLER et al., 1995; WANER et al., 2001).

Entre as técnicas sorológicas a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido a mais amplamente utilizada por sua alta sensibilidade, baixo custo e fácil desenvolvimento da técnica na rotina dos laboratórios de pesquisa principalmente, não sendo uma rotina na clinica de pequenos animais de cães e gatos (ABOGE et al. 2007). Os resultados falsos negativos também podem ocorrer em animais filhotes ou com baixa concentração de anticorpos devidos infecções com menos de 7 dias de incubação como em infecções recentes em que o animal não consegue soroconverter para sensibilizar (TABOADA; MERCHANT, 1997; ALMOSNY, 2002; BOOZER; MACINTIRE, 2003).

Desde que Inokuma et al. (2003) iniciaram pela primeira vez seus trabalhos de detecção de *B. vogeli* em carrapatos, diversos métodos moleculares com suas variações vêm sendo utilizados. Com suas características peculiares pela detecção de quantidades mínimas de material genético em determinada amostra testada, sendo uma das vantagens, sugerem-se muito esse diagnóstico. Entretanto devido ao custo-benefício e a outros empecilhos restritos a rotina clínica veterinária, no Brasil, seu uso ainda se restringe a pesquisa (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Apesar de um pequeno percentual, ainda não representativo de clientes na clínica veterinária, já está aderindo a esse tipo de diagnóstico.

2.3.8. Tratamento

O primeiro tratamento realizado para a babesiose de que se tem o conhecimento, retrata um marco histórico na medicina veterinária que descreve o primeiro tratamento

medicamentoso contra a babesiose com sucesso. Os pesquisadores da época utilizaram o corante azul de tripano que era capaz de destruir o parasito *Piroplasma canis* no sangue; atualmente o protozoário é chamado de *B. canis*. O resultado da eficácia foi salvar os animais da anemia hemolítica imunomediada fatal. Logo em seguida, o mesmo tratamento foi estendido com sucesso para bovinos infectados por *Babesia* (NUTTAL; HADWEN, 1909).

Novos trabalhos foram inpulsionados com essa descoberta que foram marcadas em diferentes décadas. Na década de 1950, os pesquisadores desenvolveram e testaram a eficácia e do diaceturato de diminazeno com ensaios clínicos para testar eficácia terapêutica obtendo sucesso consolidado até os dias de hoje (JENSCH, 1955; FUSSGÄNGER; BAUER, 1958). Já na década de 1960, o primeiro trabalho foi a descrição e relato da eficácia do imidocarb com a inovação de tratamento curativo (BEVERIDGE, 1969). Logo em seguida na próxima década os trabalhos em grandes animais foram surgindo (WOOD, 1971) e em pequenos animais domésticos também (ADAMS, 1973).

Duas décadas depois, começaram a surgir trabalhos com a estratégica terapêutica de combater até então, a especulação de uma possível resistência aos compostos utilizados na rotina, principalmente nos casos relatados de persistência de *B. gibsoni*. Logo, em 1996 foi demonstrado em um trabalho que a doxiciclina in vivo em monoterapia era capaz de reduzir a parasitemia em cães com *B. canis* (VERCAMMEN et al., 1996).

Em 2006, pesquisadores na tentativa de novas terapêuticas para *B. gibsoni*, utilizaram monoterapia com Clindamicina para diminuir a carga parasitária e estimular a resposta imune celular (WULANSARI et al., 2003). E nos anos subsequentes a tripla terapia com Clindamicina + Metronidazol + Doxiciclina (SUZUKI et al., 2007) e Doxiciclina + Enrofloxacina + Metronidazol, foram instituídas com objetivo de combater e como alternativa para os casos refratários não apenas de babesiose, também os casos de hemoparaitoses (LIN; HUANG, 2010).

Recentemente em 2020, o trabalho de Suzuki et al. (2007) foi chancelado por Jeffries et al. (2020) como protocolo por período prolongado de até 90 dias para cães em tratamento refratário com atovaquona e azitromicina, que não é uma realidade no Rio de Janeiro. Acredita-se que também essa terapêutica não seja realidade na rotina das clínicas veterinárias no Brasil.

Apesar das inovações na terapêutica da babesiose em cães com diversos trabalhos com a utilização de novas drogas e suas combinações, ainda se faz presente na rotina de clinicas veterinárias no Rio de Janeiro, a utilização da terapia com imidocarb 3-5 mg / kg a cada 14

dias em casos de diagnóstico confirmado ou uso da mesma terapêutica utilizada para erliquiose 5 mg /kg/ sid/ 28 dias até fechar diagnóstico evitando que animal fique sem tratamento até o dignóstico definitivo.

2.4. *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Raillet & Henry, 1911

2.4.1. Histórico da Dirofilariose canina

A dirofilariose é uma doença conhecida mundialmente como a doença do verme do coração que acomete principalmente o cão doméstico como hospedeiro definitivo, sendo descrito primeiramente nos Estado Unidos da America por Leidy em 1850 e foi denominado de. *Filaria immitis* (LEIDY, 1856). Entretanto, naquela época, acreditava-se erroneamente (Até hoje na rotina de clínica médica ainda acontece) que todas as microfilárias encontradas no sangue periférico de cães nos Estados Unidos pertenciam à espécie *D. immitis.* Diante disto, somente no ano de 1956, Newton e Wright publicaram formalmente a descrição **t**axonomia da espécie e as bases fundamentais para o diagnóstico diferencial de microfilárias de *D. immitis* em relação a outros filarídeos circulantes em cães como o *Acanthocheilonema reconditum, D. repents, C. bainhae etc*.

Até onde sabemos, esse é o estudo clássico em que os autores demonstraram a existência de múltiplos filarídeos e elaboraram os critérios morfológicos e morfométricos (comprimento, largura e formato da extremidade cefálica e caudal) utilizados até hoje na rotina laboratorial para o diagnóstico diferencial clássico entre os filarideos que acomentem cães (NEWTON e WRIGHT, 1956).

A dirofilariose é uma doença parasitária de evolução crônica provocada pelo nematoide *D. immitis*, que acomete o sistema cardiovascular de canídeos, além de ampla variedade de espécies, entre elas o homem. No Brasil a dirofilariose canina possui estudos que datam desde 1978, a humana desde 1887 e a felina desde 1921 (ALMOSNY, 2002). Os gatos, hoje são conhecidos como hospedeiros de *D. immitis*, no passado eram citados como acidentais. Alguns autores classificam como susceptíveis a desenvolver doença grave devido ao crescente casos de diagnóstico nesta espécie (DONAHOE, 1974; GUERRERO et al., 1992; McCALL et al., 1994, ALGERIBI et al., 2020b; MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2021)

O gênero *Dirofilaria* inclui duas espécies de importância médico veterinária: *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Raillet & Henry, 1911, e *D. repens* (Raillet e Henry, 1911). *Dirofilaria. repens* é uma espécie pouco registrada no país e merece atenção uma vez

que a doença humana a ela associada seja grave. *D. immitis* acomete com maior frequência os cães (*Canis lupus familiaris,* Linnaeus, 1758) embora possa infectar outras espécies de canídeos e felídeos (*Felis catus,* Linnaeus 1758), além de várias espécies de animais silvestres.

É pertinente mencionar que no caso de *D. repens* (Raillet e Henry, 1911) o histórico de sua ocorrência, é praticamente nula na rotina da clínica veterinária na zona oeste. Este fato reside por não haver a preocupação ou interesse no diagnóstico de *D. immitis* e *D. repens* por parte dos laboratórios, visto não trabalharem com a PCR específica para oferecer o diagnóstico diferencial. Desta forma, há necessidade de diferenciar os casos positivos e identificar a ocorrência das principais espécies que liberam microfilárias em cães da zona oeste, visto que o simples achado de microfilárias em esfregaço não fecha o diagnóstico. Esta conduta reduzirá os tratamentos desnecessários, até porque, qualquer diagnóstico positivo de um cão microfilarêmico no test knott modificado, no exame direto de esfregaço sanguíneo e no Snap 4Dx Plus é decisivo para iniciar tratamento em áreas endêmicas e carentes. (SILVA, 2022 – Dados não publicados)

2.4.2. Posição Taxonômica

Classificação sistemática atual do agente etiológico, segundo Anderson (2000) corresponde:

Filo NEMATHELMINTES
Classe NEMATODA
Ordem SPIRURIDA (Chitwood, 1933)
Superfamília FILAROIDEA (Weiland,1958) Stiles, 1907
Família ONCOCERCIDAE (Leiper, 1911)
Gênero *Dirofilaria* (Raillet & Henry, 1911)
Espécie *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Raillet & Henry, 1911

2.4.3. Ciclo Biológico e formas de transmissão

O ciclo de vida ocorre quando mosquitos culicídeos (HI) susceptíveis fazem o repasto sanguíneo em cães microfilarêmicos (HD) e infectam-se com a larva L1 (microfilárias = MF) que se desenvolvem nos túbulos de Malpighi até L3 (10-14 dias). Durante um novo repasto sanguíneo o mosquito infectará o cão com a L3. Dias depois da infecção, ainda próximo do ponto de infecção ocorre a muda para L4 (9-12 dias). As larvas então iniciam a

migração em direção ao tórax e faz muda para adultos jovens (50-70 dias) e chegam às artérias pulmonares (67º dia) pela circulação sanguínea onde se tornam parasitos maduros. A última muda corresponde a passagem para a fase de vida adulta até 70 dias após infecção, logo então os adultos jovens ou L5 apresentam grande capacidade de migração no hospedeiro vertebrado, chegando ao tórax, cabeça, pescoço e veias, inclusive jugular. Ao atingir o ventrículo direito e artérias pulmonares em 70 e 110 dias pós-infecção e continuam crescendo. Três meses depois ao chegar as artérias pulmonares ou ventrículo direito, os parasitos em maturidade sexual acasalam e o ciclo se completa com as fêmeas maduras sexualmente (120dias) produzem microfilárias, que são liberadas para a circulação (período patente: de 7 a 9 meses). Em um novo repasto sanguíneo o mosquito se infecta com L1, recomeçando o ciclo (AHS, 2018).

2.4.4. Aspectos epidemiológicos

A expansão global da área endêmica no Rio de Janeiro nesses últimos anos tem sido constatada através do aumento da distribuição geográfica desta parasitose, caracterizada por endêmica nas áreas costeiras do Brasil (LABARTHE et al., 2014) inclusive devido aos casos não autóctones encontrados em alguns trabalhos como no presente estudo. Este resultado está relacionado a falta de adesão as medidas de prevenção e controle principalmente associadas a desinformação e a baixa frequência nas consultas de rotina semestral e anual (SILVA, dados não publicados).

Quanto à prevalência, os casos de *D. immitis* estão espalhados por todas as Américas, uma vez que esse parasito foi encontrado para todos os países e territórios, exceto Chile e Uruguai (MAGGI; KRÄMER, 2019; DANTAS-TORRES et al., 2020).

Esta doença ainda é negligenciada pelas políticas públicas dos países nos quais há elevada prevalência. Regiões litorâneas tropicais e subtropicais são consideradas enzoóticas para ocorrência de *D. immitis* devido ao clima caracterizado por elevadas temperaturas e umidade, pois estão relacionadas ao criadouro de culicídeos vetores (LABARTHE et al., 2014; BENDAS et al., 2019; ALGERIBI et al., 2020b).

O mapeamento descrito no trabalho de Lucena (2010) realizado pela Secretaria de Municipal do Meio Ambiente mostra que a Zona Oeste detém o maior espaço preservado da cidade do Rio de Janeiro, sendo Guaratiba o bairro mais verde, com quase 7 mil hectares cobertos por vegetação. Porém, um dos fatores mais determinantes, é o fato desse bairro ter

características costeiras, aumentando desta forma a umidade local, através das massas de ar que chegam ao litoral com a ocorrência de maior pluviosidade nesta área, sendo extremamente importante para a proliferação de mosquitos da família Culicidae principal vetor da *D.immitis* (LABARTHE et al., 2014; BENDAS et al., 2019; TRANCOSO et al., 2020).

Outro fator que influencia diretamente como aspectos importantes na epidemiologia da dirofilariose, é a prevalência de vetores e criatórios (LABARTHE et al., 1998; BENDAS et al., 2019), assim como os fatores geográficos para o seu desenvolvimento, como o saneamento básico precário das regiões endêmicas sendo que alguns locais são inexistentes, presença de valas negras, manguezais, restingas e esgoto a céu aberto nas proximidades das residências funcionando como corredores ecológicos entre a mata e o meio urbano, havendo o confronto entre beleza da natureza da paisagem alternando-se com processos de favelização e loteamentos de alto luxo, como reflexo de urbanização descontroladas (BRANDÃO, 1994; COSTA; MOURA, 2003; LUCENA, 2010).

A prevalência da dirofilariose canina varia de acordo com a área geográfica, localização, população de mosquitos, população canina desprotegida, número de cães microfilarêmicos, técnica de diagnóstico utilizada, idade, comprimento da pelagem, cor do pêlo predominante, estilo de vida, viagens e manejo dos animais. Alguns autores mostraram que, à medida que os cães envelhecem, suas chances de se infectar aumentam, sendo a maior taxa de infecção observada entre cães de 3 a 6 anos (MONTAÑO et al., 2002; LABARTHE et al., 2014).

2.4.5. Hospedeiros vertebrados e vetores

Os cães são hospedeiros definitivos competentes para numerosos vermes filarídeos como, por exemplo: *Acanthocheilonema reconditum, D. immitis, D. repens, Cercopithifilaria bainae, C. grassii* e *Onchocerca lupi*; alguns dos quais também podem infectar outros hospedeiros mamíferos, como selvagens canídeos, gatos e humanos (OTRANTO et al., 2013)

Dirofilaria immitis é um hemoparasito nematoide filarial presente em ambiente urbano e temos mosquitos *O. taeniorhynchus, O. scapularis* e *Culex quinquefasciatus* pertencentes a família Culicidae como principais vetores em regiões costeiras (MCCALL et al., 2008; BENDAS et al., 2019) e na zona oeste do Rio de Janeiro, tendo como espécies em maior abundânica na planície costeira da região metropolitana do Rio de Janeiro, *O.*

taeniorhynchus, *O. scapularis* (BENDAS et al.,2019).

Outras espécies de mosquitos também fizeram parte da artropodofauna coletada por Bendas et al. (2019) com menores frequências e prevalências respectivamente: *Coquillettidia* sp. (Dyar, 1905); *Culex* (*Melanoconion*) sp. (Theobald, 1903); *C. declarator* (Dyar & Knab, 1906); *Anopheles albitarsis* (Lynch Arribalzaga, 1878); *Limatus* spp. (Theobald, 1901); *C. coronator* (Dyar & Knab, 1906); *C.*(*Culex*) sp. (Linnaeus, 1758); *Aedes* sp. (Meigen, 1818); *Mansonia* sp. (Blanchard, 1901); *Culex nigripalpus* (Theobald, 1901); *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932); *Phoniomyia* sp. (Theobald, 1903); *Anopheles* sp. (Meigen, 1818). Entretanto, esse estudo não se concentrou em determinar a infectividade dos mosquitos, assim como importância epidemiológica quando se considera o local, número de cães infectados e as espécies de mosquitos mais frequentes, entre tanto os autores sugerem que os vetores primários locais são *O. taeniorhynchus* e *O. scapularis* e o vetor secundário *C. quinquefasciatus*, conforme determinado anteriormente (LABARTHE et al., 1998). O gênero *Coquillettidia* ainda não foi registrado como vetor nas planícies costeiras brasileiras; porém não pode ser negligenciado, visto que este gênero foi listado como possível vetor de *D. immitis* na Itália (CANCRINI et al., 2006).

A variação mensal na frequência de *O. escapular* como principal vetor para *D. immitis* foi encontrado por causa dos padrões dos criadouros para esta espécie, visto que seus criadouros são rasos e transitórios e dependem de água limpa que pode ser fornecida pela chuva ou transbordamento de rios (FORATTINI, 2002; BENDAS et al., 2019). Foram observadas também características inerentes ao mosquito como padrão multivoltino que está relacionado ao número de gerações por ano proporcionando que aos mosquitos tenham vida longa o suficiente para transmitir *D. immitis*. (BENDAS et al., 2019).

Estudos sobre vetores de *D. Immitis* em todo o mundo se fazem necessário, além da sua biologia eecologia, mas em função de que a morfologia do vetor influencia na infectividade e competência vetorial. Em particular *O.escapular* devido a sua falta de armadura cibarial, uma estrutura anterior que pode danificar os vermes à medida que são ingeridos com a refeição de sangue (MCGREEVY et al., 1978).

O potencial de transmissão anual (PTA) foi classificado por Labarthe et al. (1998) com objetivo de correlacionar a abundância com frequência e verificar se os mosquitos mais frequentes eram aqueles com maior potencial de infectividade e consequente maior competência vetorial. O fato da espécie *O. Taeniorhynchus* ter sido coletada em 17 dos 18 meses da pesquisa (BENDAS et al, 2019) deve refletir a disponibilidade de criadouros de

água salobra, uma vez que a solo turfoso drenado permitiu inundações permanentes. Por ser abundante, carece de armadura cibarial e apóia o desenvolvimento larval para o estágio infectivo PTA (LABARTHE e t al.1998), pode ser inferido que, assim como em Niterói, é um potencialmente competente vetor *D. immitis* (BENDAS et al., 2019).

Embora *C. quinquefasciatus* também mostrou ter vida longa influenciada pelo seu padrão multivoltino assim como *O. taeniorhynchus* e *O. escapular*, a espécie é conhecida por abrigar poucas larvas infectantes, e é, portanto, considerado um vetor secundário devido ao seu baixo PTA (LABARTHE et al.,1998). Além disso, as espécies do gênero *Culex* têm a estrutura que danifica as larvas que falta em *Ochlerotatus* sp., a armadura cibarial que pode ferir microfilárias (MCGREEVY et al.,1978). A importância da armadura cibarial foi reforçada pelo fato de que densidade microfilarial em *C. quinquefasciatus* não influencia sua capacidade vetorial (CARVALHO et al., 2008), ratificando a importância nessa espécie da morfologia do aparato bucal em relação a biologia da infectividade nesses vetores.

Apesar de ser encontrada geralmente em coração e em vasos sanguíneos *D. immitis* já foi relatada em estômago (RAPHAEL, 2015), pulmões (MATTOS et al., 2008) e globo ocular (DANTAS-TORRES et al.,2009) tendo como hospedeiro mais frequente (*Canis lupus familiaris* Linneus ,1758) o cão doméstico. Além disso, foi relatado em outros animais assim como gato (*Felis catus*) (ALBERIGI et al., 2020b), raposa (*Vulpes vulpes*) (TOLNAI et al., 2014), quati (*Nasua nasua*) (MORAES et al., 2017), furão (*Mustela putorius furo*) (MOLNÁR et al., 2010), lobo (*Canislupus*) (MORONI et al.,2020), lêmure (*Microcebus rufus*) (ZOHDY et al., 2019), coiote (*Canis lupus latrans*) (TOCA et al., 2017), leopardo (*Panthera pardus pardus*) (MAZZARIOL et al., 2010), gato-do-mato (FILONI et al., 2009), leão (TOCA, 2017), foca (*Phoca vitulina*) (ALHO et al., 2017), leão-marinho (*Zalophus californianus*, *Arctocephalus pusillus pusillus*) (ALHO et al.,2017; FARRIOLS et al.,2020) e lontra (*Lutra lutra*) (PENEZIĆ et al., 2018).

2.4.6. Patogenia e alterações clínicas e laboratoriais

As microfilárias penetram no tecido subcutâneo e muscular do hospedeiro vertebrado, através do ato do hematofagismo do hospedeiro invertebrado. Nos vasos sanguíneos, atingem o coração mais especificamente no ventrículo direito, as artérias pulmonares, e ocasionalmente a veia cava caudal, veia hepática e veias coronárias, em um período de 90 a 100 dias após a infecção, tornando-se parasitos adultos (NELSON & COUTO, 2005; MATTOS JUNIOR, 2008). Após o acasalamento entre machos e fêmeas,

estas liberam microfilárias na circulação sanguínea, que são diagnosticadas em quantidades variadas no hospedeiro vertebrado. As lesões causadas pelos parasitas iniciam-se quando endotélio das artérias pulmonares é traumatizado mecanicamente pelos vermes adultos, havendo descamação endotelial o que estimula adesão e ativação de plaquetas e aderência de neutrófilos e macrófagos ativados. O endotélio lesado, antes impermeável, permite a passagem de proteínas séricas e fluido plasmático, levando a alterações endoteliais e parenquimatosas tais como hiperemia, edema e inflamação (RAWLINGS, 1980; MUPANOMUNDA et al., 1997). Estas alterações endoteliais aumentam a resistência da circulação pulmonar, servindo de estímulo para dilatação e hipertrofia progressivas do coração direito. Este endoparasito é responsável por severas lesões cardiocirculatórias e manifestações de insuficiência cardíaca e curso clínico fatal (LOMBARD, 1987).

A principal confusão é não distinguir entre animais portadores da infecção pelo verme do coração e animais portadores de uma doença cujo agente etiológico é o verme do coração. A maioria dos animais são assintomáticos fazendo necessária a investigação profilática por uma consulta com um clínico veterinário ao examinar o animal ter em mente que a presença ou ausência do parasita adulto não exclui a doença e pelo menos dois métodos de diagnóstico se faz necessário para o diagnóstico desta enfermidade que muitas vezes, mesmo em região endêmica, se mostra como “infecção oculta” (TRANCOSO et al., 2020).

Os cães são os hospedeiros definitivos nos quais o parasita é mais frequentemente encontrado, por isso maior número de casos e relatos de patogenia encontramos como achado essa espécie. Sendo uma doença de evolução crônica e sua gravidade é proporcional a carga parasitária, duração da infecção ou resposta do hospedeiro. Os sinais clínicos vão depender da gravidade das lesões e evolução da enfermidade, desse um quadro assintomático, manifestações clínicas discretas, que evoluem para tosse crônica, perda de peso, mucosas pálidas, anemia, trombocitopenia, podendo chegar à caquexia, ascite, dispneia, e intolerância total ao exercício e morte, em decorrência de insuficiência cardíaca congestiva (ATWELL et al., 1988). Já foi encontrado também casos de epistaxe e hemoptise associado a coinfecções com erlichiose na rotina de uma clínica veterinária de Pedra de Guaratiba, área endêmica. (SILVA 2022, observação pessoal)

As alterações morfológicas e histopatológicas são dignas de estudos e investigação, visto que são alterações sistêmicas que causam grande impacto na vida do animal, justificando desta maneira as ações de profilaxia e controle desta doença. Este agravo é

considerado uma zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1979 e sendo umas das filarioses que acometem os humanos acidentalmente. Rins e fígados são afetados de forma considerável. Nos rins há diminuição da filtração glomerular devido isquemia da circulação renal (OSBORNE et al., 1980) e alterações da microvascularização e perfusão não necessariamente associada a azotemia (LUDDERS et al., 1988). Glomerulonefropatia imunomediada, glomeruloesclerose e nefrite intersticial crônica são descritas (PAES-DE-ALMEIDA, 2000). As lesões renais estão correlacionadas com a duração da infecção e com a concentração da carga parasitária de microfilárias circulantes (PAES-DE-ALMEIDA, 2001).

Outro órgão também a sofrer lesões muitas vezes irreversíveis, decorrente da insuficiência cardíaca congestiva crônica direita, exibindo congestão venosa passiva e crônica é o fígado. Pode apresentar síndrome da veia cava devido albergar grandes massas de vermes, que pode se dar devido migração retrógradadessesvermes das artérias pulmonares eventrículos direito para o orifício da válvula tricúspide, átrio direito e veia cava. Esta síndrome é geralmente mais comum em animais jovens, provenientes de locais livres do parasita, que são levados a áreas enzoóticas (JACKSON et al., 1977).

Infecção maciça de larvas infectantes durante curto espaço de tempo favorece a chegada de muitos vermes ao coração e artérias pulmonares, o que predispõe a forma aguda. Animais afetados apresentam fraqueza, anorexia, depressão, principalmente dispneia, icterícia, mucosas pálidas, tempo de preenchimento capilar prolongado, há pulso jugular, hepatoesplenomegalia, hemoglobinúria, colapso e choque podendo chegar à morte em poucas horas nesses casos (SUTTON, 1988; RAWLINGS; CALVERT, 1989; CALVERT, 1995).

Ocasionalmente encontramos na literatura, vermes adultos de *D. immitis* em locais pouco comum, como cérebro (MANDELKER et al., 1971; CARLISLE et al., 1984; HAMIR, 1987), espaço epidural (BLASS et al., 1989), artéria femoral (COOLEY et al., 1987), abcessos em membros pélvicos (COLES, 1988), globo ocular (FORNAY, 1985; HATKIN et al., 1985; MILLER; COOPER, 1987; CARASTRO et al., 1992). Há relatos de
dados ainda não publicados de presença de microfilárias em cavidade abdominal de cães no momento de cirurgias eletivas.

2.4.7. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial mais antigo da dirofilariose em animais vivos é feito pelo

exame direto através da identificação de microfilárias na circulação periférica como teste knott modificado ou pela detecção de antígeno do verme adulto em amostras de sangue total ou soro (McTIER et al., 1995). No animal morto o exame recomendado é a necropsia (RODRIGUES, 2020). A recomendação geral para levantamento epidemiológico e diagnóstico é que ambos os métodos sejam usados, principalmente porque até 30% dos cães não desenvolverão microfilaremia, em uma situação conhecida como infecção oculta (LABARTHE et al., 1997; MCCALL et al., 2008). Os testes de antígeno *D. immitis* disponíveis comercialmente identificam infecções com mais de um parasita adulto fêmea e são quase 100% específicos.

A PCR, Polymerase Chain Reaction também é utilizada como método para identificação de filarídeos que infectam os cães usando uma técnica com diversos primers específicos para as diferentes espécies de filarídeos da família Onchocercidae (RISHNIW et al., 2006). A PCR direcionada à região ITS2 do rDNA de vermes filariais apresentou prevalência menor do que a demonstrada pelo teste (Snap4Dx®) e foi associada a infecção oculta ou possível falha na extração de DNA (BORTHAKUR et al., 2015)

Os diversos exames realizados na clínica veterinária como os de biologia molecular (PCR) com menor frequência com resultados negativos e positivos no SNAP 4Dx PLUS® podem indicar infecção ou não, portanto o médico veterinário deve ter em mente que os exames clínicos são extremamente importantes e que apenas um teste diagnóstico não é suficiente para determinar se um cão tem hemoparasitose ou não, e a complementação de um teste molecular e um teste sorológico será útil para fechar o diagnóstico (MEDEIROS et al., 2020).

Um estudo realizado em Niterói, foi feita a comparação entre técnicas de diagnóstico para dirofilariose e verificaram que o teste sorológico Snap 4Dx mostrou-se mais sensível que o exame de PCR (TRANCOSO et al., 2020). O mesmo autor ao avaliar a sensibilidade dos testes, verificou que amostras com microfilaremia, apresentavam positivas no test knott modificado e na PCR apresentaram negativas, sendo reportado 4 animais com este resultado, além de 30 amostras positivas na sorologia, 14 amostras negativas no PCR.

Com objetivo de entender a sensibilidade e especificidade de cada método de diagnóstico, além de investigar filarídeos não identificados, Trancoso et al. (2020) realizaram diversas PCRs totalizando 4 reações. A primeira PCR foi testar as amostras amicrofilarêmicas, que permaneceram negativas. As 8 amostras positivas pelas técnicas microscópicas parasitológicas, foram negativas na primeira PCR (PCR1). Na PCR 2, essas

oito amostras apresentaram positividade, indicando ausência de inibidores da amplificação do DNA. Na PCR3 mostrou positividade em 4 amostras, enquanto 4 permaneceram negativas, total de 8 amostras testadas. Após essa tentativa, o DNA das quatro amostras negativas foi reextraído e o PCR3 foi repetido sem amplificação. Após a falha do PCR3 em mostrar qualquer positividade nessas quatro amostras, outro PCR (PCR4) foi realizado usando um primer panfilarial (DIDR), a fim de investigar a possibilidade da presença de algum outro filarídeo e para tentar usar outra sequência para amplificação de *D. immitis*. Neste PCR4, houve amplificação de três amostras com bandas em torno de 500 a 600 bp, ou seja, ligeiramente acima do controle positivo para *D. Immitis* e compatível com outro filariídeo: *Acanthocheilonema reconditum*. Essas três amostras foram então sequenciadas e a presença de DNA de *A. reconditum* foi confirmada.

O número de sequências de PCRs executadas assim como comparação entre os testes de diagnóstico para investigar outro filarídeo, não fazem parte da rotina das clínicas veterinárias no Rio de Janeiro e acreditamos tão pouco nas outras clínicas por todo Brasil. Esta prática é restrita as universidades federais e estaduais com entidades e órgãos de fomento à pesquisa; corroborando com outros trabalhos nesta área (DANTAS-TORRES et al., 2020).

2.4.8. Tratamento

Nos primórdios do estudo de tratamento curativo para a dirofilariose, semelhante como no início para a erliquiose e a babesiose, foi com o uso dos arsenicais. Em 1947 um dos primeiros trabalhos que iniciam a terapia adulticida, são descritas as tentativas de tratamento com o composto arsenical fenilarsenóxido, que deu origem ao Carpasolate (tiacetarsamida sódica) evidenciaram eficácia limitada devido a hepatotoxidade e sem estudos de margem de segurança (OTTO; MAREN, 1947).

Os estudos continuaram em 1963 com a tentativa de padronização no tratamento com a utilização dos compostos arsenicais via endovenosa com tiacetarsamida sódica. Entretanto o presente estudo demonstrou que ainda exisitia uma margem de segurança baixa devido aos casos de tromboembolismo pulmonar obstrutivo além dos danos renais e hepáticos (JACKSON, 1963)

No ano de 1988, foi um marco no tratamento e profilaxia da dirofilariose visto que registrou a transição do tratamento para as lactonas macrocíclicas. A utilização da ivermectina em doses baixas em microgramas foram responsáveis pela eliminação de larvas

com eficácia de 100% com a morte de L3 e L4 interrompendo ciclo de larvas L5 a se desenvolver em vermes adultos (CAMPBELL, 1988).

Duas décadas depois dos primeiros registros da utilização de invermectina, que foi utilizada em larga escala para o controle e prevenção da dirofilariose em cães, logo após a quimioprofilaxia no Brasil, as infecções por dirofilariose canina caíram e se tornaram raras chegando a 2% (LABARTHE et al., 2003). O uso de ivermectina neste momento estava sendo utilizada de forma indiscriminada para endoparasitas e ectoparasitas de cães, gatos, aves, coelhos, equinos, caprinos e bovinos visto que em congressos de parasitologia e clinica nesta época, não faltavam publicações e banners com a palavra chave "ivermectina" (SILVA, 2022 - observação pessal).

Com o enfoque no tratamento adulticida, um estudo que comparou a nova molécula cloridrato de melarsomina (nome comercial Immiticide), frente a tiacetarsamida demonstrou que o novo medicamento apresentou maior segurança e eficácia para cães jovem e adultos e reduziu as taxas de letalidade, visto que houve mudança na via de aplicação para intramuscular versus endovenosa além da toxicicdade da molécula em causar tromboembolismo (RAYNAUD et al., 1992)

Novos estudos foram conduzidos para o tratamento da dirofilariose com o enfoque microfilaricida, visto que a baixa adesão e as falhas no tratamento foram responsáveis pelo aumento da prevalência (LABARTHE et al., 2014). Em 1998 outros trabalhos foram conduzidos com novas drogas que foram introduzidas no mercado com ação microfilaricida, sendo as moléculas: moxidectina, milbemicina oxima e selamectina, expandindo desta forma as opções de profilaxia para o médico veterinário (MCCALL et al., 1998).

Em 2001 após reorganização das bactérias da ordem Rickettsiales a *Wolbachia* foi incluída como gênero dentro na família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001) novos estudos foram conduzidos com a mudança no tratamento da dirofilariose. O alvo agora seria eliminar a ação endossimbionte da *Wolbachia* com o uso da doxiciclina para interromper a embriogênese das novas microfilarias (BAZZOCCH et al., 2008)

Em 2014 a maior autoridade científica do mundo em estudos de dirofilariose, American Heartworm Society (AHS) publicou as diretrizes oficiais estabelecendo o protocolo de eleição mundial ("Gold Standard") para o tratamento em 30 dias de doxiciclina seguidos por uma dose injetável de melarsomina / mês (3 doses) (NELSON et al., 2014).

Na inovação do tratamento da dirofilariose um estudo foi realizado como ensaio clínico multicêntrico e longitudinal consolidando a segurança e a eficácia biológica da moxidectina

injetável em suspensão lipídica de liberação lenta (tecnologia de microesferas do ProHeart SR12). O estudo comprovou que uma única aplicação garante 100% de proteção por 12 meses consecutivos contra o desenvolvimento de infecções induzidas de *Dirofilaria immitis* (KRAUTMANN et al., 2020).

Diante dessa inovação estudos já foram conduzidos no Rio de Janeiro para utilização desta droga não apenas com ação profilática e sim ação curativa em animais gestantes e adultos com taxas expressivas de negativação sorológica e de microfilárias ao longo de um ano sem induzir lesões e efeitos adversos (ALBERIGI et al., 2019 e 2020). Entretanto sabemos que muitos animais ainda ficarão desassistidos, visto que esse tratamento é restrito a uma pequena parcela da população desprotegida. (SILVA, 2022 - Dados não publicados).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; PERRET, C.; VIAL, P.; RAMÍREZ, J.M.; MELÉNDEZ, C.A.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1392-1395, 2007.

ABDULLAHI, S. U.; MOHAMMED, A. R.; TRIMNELL, A. R.; SANNUSI, A.; ALAFIATAYO, R. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 145-147, 1990.

ABOGE, G. O.; JIA, H.; TERKWIROON, T.; GOVINDY, Y.; KURIKAMI, M.; NISHIKAWA, Y.; IIGARASHI, I.; XUAN, X. Expression of recombinant *Babesia gibsoni* heat shock protein 70 and its evaluation as a diagnostic antigen for canine babesiosis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 4, p. 365-371, 2007.

ADAMS, L. G. Clinicopathological characteristics of canine babesiosis and its treatment with imidocarb dipropionate. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 34, n. 10, p. 1317-1323, Oct. 1973.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil, **Entomological Society of America,** v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.

ALBERIGI, B.; DESOUZA, C.; FERNANDES, J.I.; MERLO, A.; LABARTHE, N. Use of slow-selease injectable moxidectin for treatment of *Dirofilaria immitis* infection during pegnancy. **Frontier Veterinary Science**, v. 6, n. 440, p. 1-4, 2019.

ALBERIGI, B.; FERNANDES, J.I.; PAIVA, J.P.; MENDES-DE-ALEMIDA, F.; KNACKFUSS, F.; MERLO, A.; LABARTHE, N.V. Efficacy of semi-annual therapy of an extended-release injectable moxidectin suspension and oral doxycycline in *Dirofilaria immitis* naturally infected dogs**. Parasites & Vectors**, v. 503, n. 13, p. 1-8, 2020a.

ALBERIGI, B.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, G.S.R.; FERNANDES, P.A.; LABARTHE, N.; MENDES-DE-ALMEIDA, F. Unusual feline *Dirofilaria immitis* infection: a case report, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.29, n.3, p.1-5, 2020b.

ALBERNAZ, A.P.; MIRANDA, F.J.B.; MELO, A.O.; MACHADO, JÁ; FAJARDO, H.V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALHO, A.M.; MARCELINO, I.; COLELLA, V.; FLANAGAN, C.; SILVA, N.; CORREIA, J.; LATROFA, M.S.; DOMENICO, O.; CARVALHO, L.M. *Dirofilaria immitis* in pinnipeds and a new host record. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 142, p. 1-6, 2017.

AMYX, J. L.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; LEWIS, G. E. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250-255, 1980.

AMYX, J. L.; HUXSOLL, D. L.; ZEILER, L. A.; HILDEBRANDT, P. K. Therapeutic response of tropical canine pancytopenia to tetracycline hydrochloride and chlortetracycline. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, n. 11, p. 1428-1432, 1971.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D.C.; BARNS, S. M. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2741–2745, dec. 1991.

ANDERSON, B. E.; GREENE, C. E.; JONES, D. C.; DAWSON, J. E. *Ehrlichia ewingii* sp. nov. the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 42, n. 2, p. 299-302, 1992.

ANTOGNONI, M T; PASQUALI, F; BELLI, P.; MECHELLI, L.; MIGLIO, A. Anaplasma platys infection in dogs: clinical and haematological findings in 42 cases. **Veterinary Record**, v. 174, n. 15, p. 380, 2014.

ARRAGA-ALVARADO, C. M.; QUROLLO, B. A.; PARRA, O. C.; BERRUETA, M. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1161-1165, 2014.

ATWELL, R. B.; BOREHAM, P. F. L.; BUORO, I. B. J. The pathogenesis of canine dirofilariasis. **The Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 4, p. 250-256, 1988a.

ATWELL, R. B.; SUTTON, R. H.; MOODIE, E. W. Pulmonary changes associated with dead filariae (*Dirofilaria immitis*) and concurrent antigenic exposure in dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 98, n. 3, p. 349-361, 1988b.

ALMEIDA, A.B. P. F.; SOUSA, V.R. F.; DANTAS-TORRES, F.; ALMEIDA, R. C.; COSTA, K. S.; SILVA, J. A.; TORRES, S. M.; LABRUNA, M. B. Coinfection with Ehrlichia canis, Anaplasma platys, and Babesia vogeli in dogs from Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 156-160, 2012.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202p. Tese (Doutorado). **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. Seropédica. Rio de Janeiro. 1998.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. 1ª ed. Rio de Janeiro: **L.F.Livros**, 2002. p.13-56.

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. Disponívelem https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines, 2018.

BABÈS, Victor. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences,** *v.* 107, p. 692-694, 1888.

BANETH, G. Antigenic and molecular methods for the diagnosis of vector-borne diseases in dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 348-357, 2009.

BARR, Stephen C. What to do with *Ehrlichia canis*/*Anaplasma phagocytophilum* positive cases**. Westbrook:** College of Veterinary Medicine, IDEXX Laboratories, 2009.

BAZZOCCHI, C.; MORTARINO, M.; GRANDI, G.; FAFARDO, R.; GENCHI, C.; BANDI, C.; KRAMER, L. H. Combined doxycycline and ivermectin treatment of *Dirofilaria immitis* with particular reference to the symbiont *Wolbachia* and microfilarial load. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3-4, p. 313-323, 2008.

BEAUFILS, J. P.; INOKUMA, H.; MARTIN-GRANEL, J.; JONGEJAN, F.; BROUQUI, P. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 153, n. 10, p. 629-633, 2002.
BEVERIDGE, E. Babecidal activity of imidocarb [3,3'-bis- (2-imidazolin-2-yl) -carbanilide] in mice. **Research in Veterinary Science**, London, v. 10, n. 6, p. 534-539, 1969.

BEALL, M. J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M. D.; CYROG, P. E.; WERNER, L.L.; BREITSCHWERDT, E. B. Serological and molecular prevalence of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Salt Lake City, Utah. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 2-3, p. 145-152, 2005.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and Babesia canis DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; SAVARY, K. C. M.; BREITSCHWERDT, E. B. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 2, p. 125-128, mar. 1999.

BONFANTI, U.; ZINI, E.; MINETTI, E.; ZATELLI, A. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 618-624, 2004.

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

BAKER, D. C.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M.; HARVEY, J. W. Anaplasma platys-induced thrombocytopenia in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 1, n. 1, p. 32-37, 1987.

BAKER, D. C.; GAUNT, S. D.; BABIN, M. M. Evaluation of doxycycline hyclate for the treatment of experimental *Ehrlichia platys* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 8, p. 834-837, 1997.

BRANDÃO, C. R. A partilha da terra: a ecologia urbana e os conflitos sociais na produção do

espaço costeiro. Rio de Janeiro: **Relume Dumará**, 1994. 214 p.

BRANDÃO, Leonardo Pinto; HAGIWARA, Mitika Kuribayashi. Babesiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 7, n. 41, p. 50-59, 2002.

BRION, A. A new equine disease: Anaplasmosis and it causal parasite, *Anaplasma equi*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 217, p. 709-710, 1943.

BENDAS, A.J.R.; BRANCO, A.S.; SILVA, B.R.S.A.; PAIVA, J.P.; MIRANDA, M.G.N.A; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N.V. Mosquito abundance in a *Dirofilaria immitis* hotspot in the eastern state of Rio de Janeiro, Brazil, **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 18, n. 1, p. 1-4, 2019.

BLASS, C.E.; HOLMES, R.A.: NEER, M. Recurring tetraparesis attributable to a heartworm in the epidural space of a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, p.787-8. 1989.

BORTHAKUR, S.K.; DEKA, D.K.; ISLAM, S.; SARMA, D.K.; SARMAH, P.C. Prevalence and molecular epidemiological data on *Dirofilaria immitis* in dogs from NortheasternStatesof India. **The Scientific World Journal,** v.1, p. 1-7, 2015.

BRANDÃO, A. M. P. M. As Alterações Climáticas na Área Metropolitana do Rio de Janeiro: Uma provável influência do crescimento urbano. In: ABREU, M. de A**. Natureza e Sociedade** no Rio de Janeiro. R.J. Secretaria Municipal de Cultura, Turismo e Esportes,1992, p.143-200.

BREITSCHWERDT, E. B.; MALONE, J. B.; MCGRATH, R. K.; CORSTVET, R. E.; JOHNSON, J. M. Retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 3, p. 303-312, 1987.

BREITSCHWERDT, E. B.; PAPICH, M. G.; HEGARTY, B. C.; GILGER, B.; HANCOCK, S. I.; DAVIDSON, M. G. Efficacy of doxycycline, imidocarb dipropionate, or enrofloxacin in the treatment of *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 42, n. 2, p. 362-368, 1998.

BROWNG.K.; MARTINA. R.; ROBERTST.K.; DUNSTAN R.H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs inAustralia. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, n. 1, p. 101-102, 2005.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R. S.; SZABÓ, M. P. J.; FAMADAS, K. M**.** Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental & Applied Acarology**, v. 50, p. 361-374, 2010.

CANCRINI, G.; MAGI, M.; GABRIELLI, S.; ARISPICI, M.; TOLARI, F.; DELL'OMODARME, M.; PRATI, M.C. Natural vectors of Dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, Central Italy. **Journal Medicine Entomology**. v. 43, n. 3, p. 574– 579, 2006.

CARASTRO, S.M.; DUGAN, S.J.; PAUL, A.J. Intraocular dirofilariasis in dogs. **Compendium Continued Education Practic Veterinary**. v. 14, p. 209-217, 1992.

CARLISLE, M. S.; WEBB, S. M.; SUTTON, R. H.; HAMPSON, E. C.; BLUM, A. J. (1984). Case report-adult Dirofilaria immitis in the brain of a dog. Completar

CACCIO, S.M.; ANTUNES, Fátima; MACRI, Giuseppe; POZIO, Edoardo. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs in western Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 285-292, 2002

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRE, C.; SCHETTERS, T; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis, Babesia canis voaeli, Babesia canis rossi*: Differentiation of the Three Subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on Amplified Small Subunit Ribosomal RNA Genes, **The Journal Eukaryotic Microbiology,** v. 43, n. 3, p. 298-301, 1999.

CARRILHO, B.J.; RESENDE, H.E.B.; MASSARD, C.L. Erlichiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro. Anais.p. 162, 1976.

CARVALHO, G.A.; ALVES, L.C.; MAIA, R.T.; ANDRADE, C.F.S.; RAMOS, R.A.N.; FAUSTINO, M.A.G. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* say, 1823 exposed to different densities of microfilariae of *Dirofilaria immitis* (Leidy,1856). **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 52, n. 4, p. 658–662. 2008.

CALVERT, C. A. Caval syndrome. In: BONAGURA, John D. (ed.). **Kirk's Current Veterinary Therapy XII: Small Animal Practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 848-853.

CAMACHO, Alberto T.; PALLAS, Encarna; GESTAL, Juan J.; GUITIAN, Francisco J.; OLMEDA, Angeles S.; GOETHERT, Heidi K.; TELFORD, Sam R. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **Veterinary Record**, v. 149, n. 18, p. 552-555, 2001.

CAMPBELL, W. C. Ivermectin: an update on parasitic applications in veterinary medicine. **New England Journal of. Medicine**, v. 318, n. 4, p. 212-216, 1988.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P. M.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis, Babesia canis vogeli, Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CASTRO, M. B. Estudo clínico, hematológico e imunopatológico da infecção experimental em cães com a amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis*. 2004. 110 f. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) - **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, Jaboticabal, 2004

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, C. A. TINUCCI

COSTA, M. Experimental acute canine monocytic erhlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary. Parasitologic**, v. 119, n. 1, p. 73-86. 2004.

CASTRO, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; AQUINO, L.P.C.T.; DAGNONI, A.S.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T.; NAKAGHI, A.C.H.; SANTI, M.; CALCHI, A.C.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Immunophenotypical and pathological changes in dogs experimentally infected with Ehrlichia canis, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** v. 31, v. 2, p. 1-13, 2022.

CHAUVIN, A.; BOUHREOUR, S.; L'HOSTIS. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. ***Veterinary Research,*** v. 40, n. 4, artigo 37, p. 1-18, 2009.

CODNER, E.C.; MASLIN, W.R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection, American Journal Veterinary Research, v. 53, n. 3, p. 294-299, 1999.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Babesia equi* in Spanish dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 229-236, 2004.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 173-194, 2003.

CICUTTIN, G.L.; SALVO, N; NAVA, S. Duas novas cepas *de Ehrlichia* foram detectadas em carrapatos *Amblyomma tigrinum* associados a cães em áreas periurbanas da Argentina. **Imunologia Comparativa, Microbiologia e Doenças Infecciosas,** v. 1, n. 2, p. 1-17, 2017

COOLEY A. J., CLEMMONS R. M. & GROSS T. L. Heartworm disease manifested by encephalomyelitis and myositis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**.v. 190, p. 431–432, 1987.

COLES, LD.; NORTH, C.; SCHILLHORN VAN VEEN, T. W. Adult *Dirofilaria immitis* in hind leg abscesses of a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 24, n. 3, p. 363-365, 1988.

CONRAD, P A; THOMFORD, J W.; YAMANE, I; WHITING, J.; WALKER, L; GAUTIER, V.; LEVY, M. G. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs from California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 5, p. 601–605, 1991.

COOLEY, A J.; CLEMMONS, R M.; GROSS, T L. Heartworm disease manifested by encephalomyelitis and myositis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 10, p. 1321-1324, 1987.

CORREA, E S.; PALUDO, G R.; SCALON, M C.; MACHADO, J A.; LIMA, A C. Q.; PINTO, A T. B.; THIEBAUT, J T. L.; ALBERNAZ, A P. Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas

e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.

CORRÊA, F. R.; JORGE, R.S.; SCHILD, A. L.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Doenças de ruminantes e equídeos. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2011.

COSTA, J.O.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.P; BATISTA JUNIOR, J.A. *Ehrlichia canis* Infection in a dog in Belo Horizonte – Brasil. Arquivo da Escola Veterinária, v.25, n. 2, p. 199-200, 1973

COSTA, V.C.; MOURA, J.R.S. Análise do potencial turístico nas regiões administrativas (RAs) de Campo Grande e Guaratiba zona oeste do Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Investigaciones Geográficas**, v. 52, n. 1, p. 137-152, 2003.

COSTA-JUNIOR, L.M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M.F.B.; BEELITZ, P.; KURTPFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Soro-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal** v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

COSTA, F. A.; RIBEIRO, J. B.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. S.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B. Perfil hematológico e bioquímico de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* no agreste meridional de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 385-391, 2015.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RONDON, W. C. M.; PASSOS, L. M. F. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected dog in Minas Gerais, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 393-396, 2007.

COTA, J.M.; OROZCO, A.M.O.; BEDOYA, S.A.O.; OLIVEIRA, A.C.; VILORIA, M.I.V.; COSTA, P.R.S. Babesia spp. no líquido peritoneal em cão com ascite - relato de caso, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1109-1114, 2018.

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

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 282, p. 109-113, 2020.

DANTAS-TORRES, F; FAUSTINO, M A G; ALVES, L C. Coinfection by *Anaplasma platys*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in a dog from Recife, Pernambuco, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 371, 2004.

DANTAS-TORRES, F; FIGUEREDO, L A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F; LATROFA, M S; ANNOSCIA, G; GIANNELLI, A; PARISI, A; OTRANTO, D. Morphological and molecular identification of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks from Brazil and Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 520–525, 2013.

DANTAS-TORRES, F; LIA, R. P; BARBUTO, M.; CASIRAGHI, M.; CROVACE, A; CALIGIANI, L.; GENCHI, C.; OTRANTO, D. Ocular dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in a dog: first case report from Europe. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, n. 12, p. 667-671, 2009.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; PRADO, T. M.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* msp1 α genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates**. Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1609-1616, 2003.

DEEPA, P.M.; DIMRI, U.; RICKY, J.; RAMEES, T.P.; VIJAYKUMAR, H.; DEVI, G.; MAHENDRAN, K.; MONDAL, D.B. Secondary subclinical diabetes mellitus in dogs infected with *Ehrlichia canis.* **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n.1, p. 858-863, 2014.

DINIZ, P. P. V. P.; DE AGUIAR, D. M. Ehrlichiosis and anaplasmosis: an update. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 52, n. 6, p. 1225-1266, 2022.

DE TOMMASI, A. S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E. B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; DE CAPRARIIS, D. *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2231-2234, 2014.

DONAHOE, J.M.; KNELLER, S. K.; THOMPSON, P. E. Chylothorax subsequent to infection of cats with *Dirofilaria immitis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 164, n. 11, p. 1107-1110, 1974.

DU PLESSIS, J. L.; BOTHA, E. M.; STEVENS, K. Morphological evidence for infection of impala, *Aepyceros melampus*, with *Ehrlichia platys*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 3, p. 223-227, 1997.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence de *Rickettsia canis* au cours d'une nouvelle maladie du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DONATIEN, A. & LESTOQUATD, F. Rickettsia bovis n. sp. pathogene pour le boeuf. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 29, p. 1057-1061, 1936

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.D.; PALMER, G.H.; RAY,

S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGEagent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p. 2145–2165, 2001.

DUMLER, J. S; ASANOVA, E; BAKKEN, J S.; RICHTER, P; CHAE, J; RIKIHISA, Y. Serologic cross-reactions between *Ehrlichia equi*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, and *Ehrlichia phagocytophila*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 5, p. 1411-1413, 1995.

DUARTE, S. C.; LOULY, C.C.B; NETO, O.J.S.; ROMANOWSKI, T.N.A; JUNIOR, R.S.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnóstico parasitológico e molecular da babesiose canina na cidade de Goiânia-GO. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 229-236, 2008.

EDDLESTONE, S. M.; GAUNT, S. D.; NEER, T. M.; BOUDREAUX, M. K.; GILL, A. F.; HASCHKE, J.; CORSTVET, R. E. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 205-210, 2007.

EL-BAHNASAWY, M.M.; KHALIL, H.H.; MORSY, T.A. Babesiosis in an Egyptian boy acquired from pet dog, and a general review. **Journal Egyptian Society Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 99–108. 2011.

FALCONI, M. R.; PARRA, G.; DE CARO, V.; VITALE, M.; REALE, S. Quantitative real-time PCR to monitor *Ehrlichia canis* load in dogs during doxycycline treatment. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 531-533, 2012.

FARRIOLS, M.; ARELLANO - CARBAJAL, F.; ELORRIAGA - VERPLANCKEN, F.R.; DAME-FERNÁNDEZ, K.; GARRIDO, E.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, R.C.; BÁRCENAS, R. T.; FLORES-MORÁN, A.E.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K. Filarial infections in alifornia sealionsvary spatially with in the Gulfof California, Mexico. **Parasitology Research**, v.119, n.4, p.1281-1290, 2020.

FILONI, C.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; CRISTO, D.S.; TORRES, L.N.; CATÃO-DIAS,
J.L. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in a Brazilian oncilla (*Leopardus tigrinus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.6, p.474-478, 2009.

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M.; GUIMARÃES, C. M.; SÁ, A. G.; ABREU, F. S.; ALMOSNY, N. P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 113-119, 2007.

FERREIRA, R F; LOPES, S.T.A.; FRANÇA, R. P.; COELHO, A. S.; CARDOSO, M. J.; ALÉSSIO, F. O. Trombocitopenia em cães: estudo retrospectivo de 105 casos**. Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2235-2240, 2008.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia médica**: identificação, biologia, epidemiologia.

São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. v. 2, 864 p

FORNAY, M.M. Dirofilaria immitis in the anterior chamber of a dog's eye. **Veterinary Medicine**, v. 80, n.6, p. 49-52, 1985.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A peculiar case of canine ehrlichiosis: severe chronic disease with diagnostic and therapeutic challenges. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 417-425, 1999.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2407-2411, 1983.

FRENCH, R. W.; HARVEY, J. W. Chemotherapy of experimental *Ehrlichia platys* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 45, n. 6, p. 1207-1210, June 1984.

FRITZ, Didier. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in Franc (March 2006 to March 2008). **Parasitology Research**, v. 106, n. 5, p. 1339-1342, 2010.

FUSSGÄNGER, R.; BAUER, F. B.: ein neues Chemotherapeuticum gegen Piroplasmoses und Trypanosomoses. **Medizin und Chemie**, Leverkusen, v. 6, p. 504-531, 1958.

GASSER, R.B. PCR-based technologies for the detection of diagnosis of parasitic infections and for investigation of parasitic populations. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 119-123, 1999.

GAUNT, S. D.; BAKER, D. C.; SIMPSON, C. F.; HARVEY, J. W.; ASQUITH, R. L.; GASKIN, J. M.; JACKSON, C. A**.** Experimental infection of dogs with *Anaplasma platys*. **American Journal of Veterinary Research,** v. 51, n. 9, p. 1410-1414, 1990.

GAUNT, S. D.; MOORE, P. F.; SIRIGIREDDY, S. V. S.; GANTA, J. P.; BOUDREAUX, M. B. Development and validation of a real-time PCR assay based on the *p44* polynucleotide for detection of *Anaplasma platys* in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 576-582, 2010.

GAZETA, G.S.; CARVALHO, R.W.; AVELAR, R.F.; AMORIM, M.; A.E.ABOUD-DUTRA, A.E. Ocorrência de *Babesia* sp em pequenos roedores no Brasil. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p.741-744, 2004.

GIANNELLI, A; RAMOS, R A N; DI PAOLA, G; MENCKE, N; DANTAS-TORRES, F; BANETH, G; OTRANTO, D. Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 1-5, 2013.

GONDE, S.; CHHABRA, S.; SINGLA, L. D.; BANSAL, B. K. Peritoneal effusion in a dog due to *Babesia gibsoni* infection. **Case Reports in Veterinary Medicine**, v. 2014, p. 1-4, 2014.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

GREENE, Craig E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. 1424 p.

GROVES, MG.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmissão da bactéria *Ehrlichia canis* para cães por carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research** v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GROVES, M G.; DENNIS, G L. *Babesia gibsoni*: field and laboratory studies of canine infections. **Experimental Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 153-159, 1972.

GUERRERO, J.; JERNIGAN, A. D.; DZIMIANSKI, M. T.; McTIER, T. L.; MARSHALL, J. M.; NEWCOMB, F. M. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in cats in Savannah, Georgia. In: SOLL, M. D. (ed.). **Proceedings of the Heartworm Symposium '92**. Batavia: American Heartworm Society, 1992. p. 71-79.

GUIMARÃES, A. Diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de agentes anaplasmataceae em felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro. 2013. 62 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Instituto de Veterinária**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

GUENDULAIN, C.; TAMIOZZO, P.; BESSONE, A.; CAFFARATTI, M.; CABELLO, S.; BONACCI, M. Detección molecular de *Ehrlichia canis* en perros de diferentes localidades de la provincia de Córdoba, Argentina. **Revista Ab Intus**. v. 7, n. 4, p. 1-3, 2021.

HAMIR, A. N. Heartworm (Dirofilaria immitis) in the brain of a dog. **Veterinary Record** 120, 207–208, 1987.

HARRUS, S.; BARK, H.; WEINER, M.; AROCH, I. Changes in leukocyte subsets, T-lymphocyte subpopulations, and MHC class II expression in dogs acute-experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, n. 1-2, p. 57-65, 2003.

HARRUS, S.; DAY, M. J.; WANER, T.; BARK, H. Development of glomerulonephritis in dogs with experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, n. 3-4, p. 271-279, 2001.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Ampicillin in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Record**, v. 140, n. 23, p. 611- 612, 1997.

HARRUS, S. et al. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 51, n. 1-2, p. 13-20, 1996.

HARRUS, S., WANER, T. & BARK, H. 1997. Canine monocytic ehrlichiosisÐan update. **Comp. Contrib. Educ. Pract. Vet**. 19: 431-4 44, 1977.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Recente advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, p.2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnóstico da erliquiose monocitotrópica canina (*Ehrlichia*

canis): uma visão geral. **The Veterinary Journal,** v. 187, n. 3, p.292-296, 2011.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Amplification of *Ehrlichia canis* DNA by PCR in splenic aspirates of dogs is a alternative changes for the diagnosis of the subclínical phase of ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; KENIGSBERG, Y.; BANETH, G.; ARONOVICI, A.; BARK, H. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2145-2148, 2004.

HARVEY, J. W.; WANER. T.; NEER, T. M. Infecção por *Ehrlichia canis* In: GREENE, C. E. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap. 26, p. 505-529.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HASEGAWA, M. et al. Evaluation of clinical, hematological and immunological findings in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 1, p. 41-47, 2005.

HATKIN, J.; MCGRATH, J. G. "An unusual manifestation of dirofilariasis." **Cabi digital library.org**, p. 52-53, 1985. Pagina 61.

HAUSCHILD, S; SHAYAN, P; SCHEIN, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. **Parasitology Research**, v. 81, n. 8, p. 638-642, 1995.

HEEB, S. M.; GRINDEM, D. B.; DEVEAU, M. A.; SUTER, S. E. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 4, p. 379-384, 2003.

HEYMAN, P.; COCHEZ, C.; VANDENVELDE, C.; DEVILLERS, E. Report of *Anaplasma platys* in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 2, p. 100-105, 2007.

HIBLER, S. C.; GREENE, C. E. Rickettsial infections in dogs. Part II: Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 2, p. 106-114, 1986.

HILDEBRANDT, P.K.; HUXSOLL, D.L.; WALKER, J.S.; NIMS, R.M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of Canine Ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia) **American Veterinary Medical Association**, v. 34, n. 10, p. 1- 12, 1973.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S. R.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.

HOSKINS, J.D. Tick-borne Zoonoses: Lyme disease, Ehrlichiosis and Rocky Montain Spotted Fever**. Small Animal**, v.6, n.3, p. 236-243, 1991.

HUXSOLL, D.L.; AMYX, Jack L.; HEMELT, P. T.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; LEWIS, G. E. Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. **Experimental Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 53-59, 1972.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; AMYX, J. L.; FERGUSON, J. A. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 6, n. 4, p. 220-225, 1970.

HUXSOLL, D.L. Canine Ehrlichiosis (Tropical canine Panytopenia): A Review. **VeterinaryParasitology**, v.2, n. 1, p. 49-60, 1976.

HUA, J; MOTOI, Y; SATO, R; INOKUMA, H; KAWASSU, S; ISHIHARA, T. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys* in Guangzhou, China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 10, p. 1095–1099, 2000.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, G. N.; RIKIHISA, Y. 16S rRNA and *groEL* gene sequences of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* detected in dogs in Venezuela. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 921-927, 2005.

INOKUMA, H; FUJII, K; OKUDA, M; ONISHI, T; BEAUFILS, J; RAOULT, D; BROUQUI, P. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of *Anaplasma platys* for phylogenetic and diagnostic studies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 9, n. 5, p. 1131–1136, 2002.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 9, p. 809-812, 2002.

INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 235-242, 2004.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 197-205, 2009.

IRWIN, P. J.; REEVE-JOHNSON, L.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; TRAUB, R. J.; COLEMAND, M. T.; DINIZ, P. P. V. P. Guidelines for the diagnosis, treatment, and control of canine monocytic ehrlichiosis in tropical and subtropical regions: TroCCAP consensus statement. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 28-39, 2021.

JACKSON, R. F.; SEYMOUR, W. G.; GROWNEY, P. J.; OTTO, G. F. Surgical treatment of the caval syndrome of canine heartworm disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 10, p. 1065-1069, 1977.

JACKSON, R. F. Thiacetarsamide for treatment of heartworm disease in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 142, n. 1, p. 23-26, 1963.

JACOBSON, L.S.; LOBETTI, R.G. Rhabdomyolysis as acomplication of canine babesiosis.

Journal Small Animal Practicque, v. 37, n. 6, p. 286–291, 1996.

JACOBSON, L. S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 126-139, 2006.

JACOBSON, L. S.; CLARK, Ian A. The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 65, n. 3, p. 134-145, 1994.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 20-27, 2007.

JEFFRIES, R; CHAU, S. C. M.; TAM, W. A. M.; RYAN, U M.; MONIS, P; REEVE-JOHNSON, L. An alternative combination therapy with metronidazole, clindamycin and doxycycline for *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Hong Kong. **Parasites & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 385-394, Aug. 2020.

JENSCH, R. 4,4'-Diamidino-diazoaminobenzol, ein neues Mittel gegen Trypanosomen- und Piroplasmen-Infektionen. **Arzneimittel-Forschung**, Aulendorf, v. 5, n. 3, p. 134-135, Mar. 1955.

JOJIMA, F.S.; GARCIA, J.L.; VIDOTTO, M.C.; BALARIN, M.R.S.; FABRETTI, A.K.; GASPARINI, M.R.; COELHO, A.L.M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KAKOMA, C. A. Platelet migration inhibition as an indicador of immunologically mediated target cell in canine ehrlichiosis. **Infection and Immunologic,** v. 20, n. 1, p. 242-247, 1978.

KAKOMA, I.; MEHLHORN, H. *Babesia* of Domestic Animals. In: KREIER, Julius P. (ed.). **Parasitic Protozoa**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1994. v. 7, p. 141-207

KARRAR, G.; EL HAG ALI, B. Oral treatment of heartwater with oxytetracycline (Terramycin soluble powder). **British Veterinary Journal**, v. 121, n. 1, p. 28-33, 1965.

KAVINSKI, L.C.; FLORIANO, B.; CARON, P.E.; BRONZE, S.J.M. Ocorrência de um caso De Erliquiose canina em Curitiba, PR. **Revista Ciência Agrárias**, v.10, n. 1-2, p.217-2018, 1988.

KIM, MD; CHOI, MS; KIM, SW; SHIN, NS; KOH, SY; CHOI, Chang-Yong; IN, Eun-Jung; CHAE, Joon-Seok. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Ticks and Small Mammals in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5766-5773, 2006.

KJEMTRUP, A.M.; KOCAN, K.M.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A.J.; REAGAN, W. J.; BANETH, G; CONRAD, P.A. There are at least three distinct small piroplasms in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4124-4131, 2000.

KOCAN, K. A.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; GARCIA-GARCIA, J.C. Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology,** Cambridge, v. 126, n. 7, p. S7-S23, 2003.

KOCH, R**.** Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. **Zeitschrift für Hygiene und Infektions krankheiten,** v. 54, n. 1, p. 1–9, 1906

KRAUTMANN, M. J.; LOGAN, T. J.; CHATTERJEE, A.; KING, G. D.; CHU, C.C.; CHEZEM, S. A.; ROWLAND, B. M.; CARITHERS, D. S. Efficacy and safety of a injectable sustained-release moxidectin microsphere formulation for the prevention of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs for 12 months. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, art. 32, p. 1-12, 2020.

KREIER, J.Parasitic Protozoan, vol.8, **Academic Press**,1994,294pp

LABARTHE, N.V.; ALMOSNY, N.R.P.; GUERRERO, J.; DUQUE-ARAÚJO, A.M. Description of the occurrence of canine dirofilariosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memóriasdo Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n. 1, p. 47-51. 1997.

LABARTHE, N.V.; PAIVA, J.P.; REIFUR, L.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; MERLO, A.; CARVALHO PINTO, C.J. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having ahigh incidenceofheartworm-infected dogs. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 493, p. 1-8, 2014.

LABARTHE, N.V.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F.; OLIVEIRA, S.J.; LOURENÇO-DE OLIVEIRA, R. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 425-432. 1998.

LABRUNA, M B; HOMEM, V S. P.; HEINEMANN, M B.; NETO, J S. F. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 649-652, 2000.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.6, n.30, p.24-32, 2001.

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YASSUDA, C. R.; MARTINS, T. F.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, jan. 2007.

LASTA, C S; SANTOS, A P; MESSICK, J B; OLIVEIRA, S T; BIONDO, A W; VIEIRA, R F C.; DALMOLIN, M L; GONZÁLEZ, F H D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 360-366, 2013.

LEMOS, T. D.; TOMA, H. K.; ASSAD, R. Q.; SILVA, A.V.; CORRÊA, R. G. B.;

ALMOSNY, N. R. P. Clinical and hematological evaluation of *Rangelia vitalii*-naturally infected dogs in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 307-313, 2017.

LEMPEREUR, L; DE CAT, A.; CARON, Y.; MADDER, M.; CLAEREBOUT, E.; SAEGERMAN, C.; LOSSON, B. First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 2, p. 125-130, 2011.

LESTOQUARD, F. Deuxième note sur les Piroplasmoses du mouton en Algérie. L'anaplasmose: *Anaplasma ovis* nov. sp. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 17, p. 784-787, 1924.

LEVINE, Norman Dion. Taxonomy of the piroplasms. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 90, n. 1, p. 2–33, 1971.

LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L.; LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; DE WAAL, D. T. Isolation of a South African vector-specific strain of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 63, n. 1-2, p. 9-16, 1996.

LEWIS, G.E., RISTIC, M., SMITH, R.D., LINCOLN, T., STEPHENSON, E.H. The brown dog tick Rhipicephalus sanguineus and the dog o experimental host of *Ehrlichia canis.* **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 1, p. 1953–1955, 1977.

LIN, Q.; RIKIHISA, Y.; OHASHI, N.; ZHI, Ning. Mechanisms of variable *p44* expression by *Anaplasma phagocytophilum*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5650-5661, 2003.

LISBÔA, R. S. Diagnóstico dos gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em cães domésticos e caracterização de *Anaplasma platys* na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. 2010. 111p. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 11, p. 1221-1231, 1998.

LOMBARD, C. W. Pulmonary vasodilation in heartworm dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 17, n. 6, p. 1435-1444, 1987.

LOULY, C. C. B. Dinâmica sazonal de Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) no canil da Polícia Militar do município de Goiânia-Goiás, Brasil. 2003. 51 f**. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2003.

LUDDERS, J. W.; GRAUER, G. F.; DUBIELZIG, R. R.; COLIN, D. B.; REIF, J. S. Renal microvascularization, perfusion, and function in dogs with *Dirofilaria immitis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 5, p. 719-724, 1988.

LORUSSO, V.; DANTAS-TORRES, F.; LIA, R. P.; TARALLO, V. D.; MENCKE, N.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* on a dog population in Italy. In: XXVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, 2010, XXVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, 2010. p. 173.

LOSOS, G.J. Manutenção da Ehrlichia no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. In: LOSOS Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals. 1986.

LUCENA, A.J. O sistema clima urbano da zona oeste/RJ: Uma contribuição ao monitoramento e análise em sistemas ambientais, **Geoambiente**, n. 15, p. 1-20, 2010.

MACIEIRA, D. B; MENEZES, R C M; DAMICO, C B; ALMOSNY, N R P; SOUZA, A J S; CHRYSSAFIDIS, A L; SCOTTI, C S; CUNHA, N R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MACINTIRE, D.K.; DROBATZ, K.J.; HASKINS, S.C.; SAXON, W.D. **Manual of Small Animal Emergency and Critical Care Medicine**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

MADIGAN, J.E.; GREIG, B.; REUBEN, J. M.; REUBEN, S. K.; HIGGINS, J. C. Coinfection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: a review of cases and diagnostic challenges. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 3, p. 345-350, 2000.

MAFRA, C.; BARCELOS, R.M.; MANTOVANI, C.; CARRIZO, J.; SOARES, A.C.; HIGO MOREIRA, H.N.S.; MAIA, N.L.; SILVA, F.F.R.; SILVA, V.H.D.; BOERE, V.; SILVA, I.O. Occurrence of *Ehrlichia canis* in free-living primates of the genus *Callithrix*, **Brazilian. Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 78-81, 2015

MAGGI, R.G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-37, 2019.

MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V; BREITSCHWERDT, E B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 103-110, 2013.

MAHONEY, D. F. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, Julius P. (org.). *Parasitic Protozoa*. 1. ed. New York: Academic Press, 1977. v. IV, p. 1-56.

MALHERBE, W. Clinico-pathological studies of *Babesia canis* infection in dogs. The influence of the infection on kidney function. **Journal Sul Afric Veterinary Assocation**. v. 37, p. 261–264, 1996.

MANDELKER, L.; BRUTUS, A.L. Feline and camne drofilarial encephalitis. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 159, n. 1, p. 776·777, 1971.

MARTIN, A. R.; BROWN, G. K.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 3, p. 176-

180, 2005.

MARTINAGLIA, G**.** Some considerations regarding the health of wild animals in captivity. **South African Journal of Science, Johannesburg**, v. 33, n. 3, p. 833–844, 1937.

MARTINS, M.; MATHEW, J. S.; SHAW, E. I.; PANTARELLO, C. A.; KOCAN, K. A.; EWING, S. A. Development of a nested polymerase chain reaction assay for detection of *Anaplasma platys* DNA in canine blood. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 2, p. 120-125, 2005.

MARTINS, T. S. W. J.; BATISTA, J. S.; DIAS, R. V. C.; VIEIRA, A. J. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O. Prevalência de *Ehrlichia canis* utilizando a técnica de nested-PCR em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 4, p. 147-152, 2005.

MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 3-4, p. 245-254, 1986.

MASSARD, C. A.; MASSARD, C.L. *Ehrlichia bovis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em Gado de Leite no Brasil, primeiro registro no Brasil, **Arquivo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguaí, v.5, n.2, p. 237-239, 1982.

MASSARD, C. A.; MASSARD, C. L.; RESENDE, H. E. B. Carrapatos de cães em áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6, 1981, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBP, 1981. p. 201

MATTOS, G.L.M.; JUNIOR, M.G.D.; TORTELLY, R.; MENEZES, R.C.; SILVA, W.O. Alterações histopatológicas em pulmões de cães portadores de dirofilariose pulmonar no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1144-1151, 2008.

MAZZARIOL, S.; CASSINI, R.; VOLTAN, L.; ARESU, L.; REGALBONO, A.F. Heartworm
(*Dirofilaria immitis*) infection in a leopard (*Panthera pardus pardus*) housed in a zoological park in north-eastern Italy. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2010.

MCCALL, J. W.; SUPAKORNDEJK, P.; SUPAKORNDEJK, N.; EVANS, C.C. Evaluation of the microfilaricidal activity of moxidectin, ivermectin, and milbemycin oxime in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 2-3, p. 141-149, 1998.

McTIER, T.L.; McCALL, J. W.; DZIMIANSKI, M. T. Evaluation of various methods for detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. In: AMERICAN HEARTWORM SOCIETY SYMPOSIUM, 1995, Auburn. **Proceedings...** Auburn: AHS, 1995. p. 111-117.

MATSUU, A.; KAWABE, A.; KOSHIDA, Y.; IKADAI, H.; OKANO, S.; HIGUCHI, S. Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 8, p. 893-897, 2004.

MCCALL, J.W.; GENCHI, C.; KRAMER, L.H.; GUERRERO, J.; VENCO, L. Heartworm diseasein animals and humans. **Advances in Parasitology**, v**.** 66, n.4, p. 193-285, 2008.

McCALL, J.W.; CALVERT, C. A.; RAWLINGS, C. A. Heartworm infection in cats: a life-threatening disease. **Veterinary Medicine**, v. 89, n. 7, p. 639-647, 1994.

MCGREEVY, P.B.; BRYAN, J.H.; OOTHUMAN, P.; KOLSTRUP, N. The lethal effects of the cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilariae. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 361–368, 1978.

MEDEIROS, M.A.S.; SILVA, M.H.; MATTA, M.A.V.; FERREIRA, E.O.; MACHADO, S.L.;
SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B.; TOMA, H.K.; XAVIER, M.S.; MEIRELLES, M.N.S.L.; ALMOSNY, N.R.P. Expression and antigenic analysis of the recombinant TRP36 protein from *Ehrlichia canis* São Paulo strain for serologic tests, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 1-12, 2020.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; ALVES, L.C.; DO AMARAL FERNANDES, P. Infecção por *Dirofilaria immitis* e outras infecções em cães e gatos do Rio de Janeiro, Brasil: A necessidade de aplicação profilática. **Acta Parasitológica**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2021.

MILLER, W.; COOPER, R.B. Identifying and treating intraocular Dirofilaria immitis in dogs.
Veterinary Medicine, v. 82, p. 381-385, 1987.

MOLNÁR,V.; PAZÁR, P.; RIGÓ, D.; MÁTHÉ, D.; FOK, É.; GLÁVITS, R.; VAJDOVICH, P.; JACSÓ, O.; BALOGH, L.; SÓS, E. Autochthonous *Dirofilaria immitis* infection in aferret with aberrant larval migration in Europe**. Journal ofSmall Animal Practice**, v. 51, n. 7, p. 393-396, 2010.

MONTAÑO, J.M.F.; ALVARADO, C.M.A.; MORILLO, M.A.; MARTÍNEZ, J.E.S. Diagnóstico de dirofilariosis canina: un estudio comparativo usando las pruebas de ELISA y de Woo. **Revista Cientifica FCV-LUZ**, v. 12, n. 5, p. 351- 358. 2002.

MORAES, J.F.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v**.** 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAIS-FILHO, J.; COSTA, F. B.; GERARDI, M.; KRAWCZAK, F.D.; COSTA, E. M. S.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M. B. Evaluation of the vector competence of *Rhipicephalus sanguineus* (sl) ticks for *Rickettsia rickettsii*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 509-519, 2015

MORAES, J.F.; KRAWCZAK, F.S.; COSTA, F.B.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLos One**, v. 10, n. 9, p. 1- 9, 2015.

MORAES, M.F.D.; SILVA, M.X.; MAGALHÃES-MATOS, P.C.; ALBUQUERQUE,

A.C.A.; TEBALDI, J.H.T.; MATHIAS, L.A.; HOPPE, E.G.L. Filarial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic dogs from Iguaçu National Park, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 1-9, 2017.

MOREIRA, S. M.; MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M. B.; BORGES, L. M. F.; PEIXOTO, M. P.; BECHARA, G. H. Erliquiose em cães: alterações hematológicas, avaliação clínica e eficácia do tratamento com doxiclina em cães infectados experimental e naturalmente com *Ehrlichia canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.

MORONI, B.; ROSSI, L.; MENEGUZ, P.G.; ORUSA, R.; ZOPPI, S.; ROBETTO, S.; MARUCCO, F.; TIZZANI, P. *Dirofilaria immitis* in wolves recolonizing northern Italy: are wolves competent hosts? **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2020.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n.1, p. 197–204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; LEONTIDES, L.; SIAKAVALAS, E. Clinical and laboratory findings in naturally occurring *Ehrlichia platys* infection in Greek dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 4, p. 240-244, 2004.

MYLONAKIS, M. E.; HARRUS, S.; BREITSCHWERDT, E. B. An update on canine monocytic ehrlichiosis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, art. 175, p. 1-13, 2019.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, K. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis, E. chaffeensis,* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 325-339, 1998.

MUPANOMUNDA, M.; WILLIAMS, J. F.; MACKENZIE, C. D.; KAISER, L. *Dirofilaria immitis*: heartworm infection alters pulmonary artery endothelial cell behavior. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 2, p. 389-398, 1997

NAKAGHI, A.C.H.; ARAÚJO, P.G.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, **Ciência Rural**, v.38, n. 1, p. 766-770, 2008.

MOHR, A. J.; LOBETTI, R. G.; VAN DER LUGT, J. J. Acute pancreatitis: a newly recognised potential complication of canine babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, n. 4, p. 232-239, 2000

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology** v. 190, p. 547-555, 2012.

NEER, T.M. et al. Consensus statement on erlichial disease of small animals from the infection disease study goup of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p. 309-315, 2002.

NEITZ, W. O. The blesbuck (*Damaliscus albifrons*) as a carrier of heartwater and bluetongue. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v. 4, n. 1, p. 24–26, 1933.

NELSON, Richard W.; COUTO, C. Guillermo. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1312 p.

NELSON, C.T.; MCCALL, J.W.; CARITHERS, D.S.; COLEMAN, M. T.; GRAHAM, W. B.; LONG, J.D.; HOPKINS, R.; REICHARD, M.V. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm infection in dogs. **American Heartworm Society Bulletin**, v. 41, n. 1, p. 1-28, 2014.

NEWTON, W. L.; WRIGHT, W. H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States, with a description of the microfilariae. **The Journal of Parasitology**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

NICHOLSON, W.N.; ALLEN, K.E.; MCQUISTON, J.H.; BREITSCHWERDT, E.B.; LITTLE, S.E., 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends Parasitology,** v. 26, n. 4, p. 205–212, 2010.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 7, n. 33, p. 10-13, 2004

NUTTALL, G.H.F.; HADWEN, S. The successful drug treatment of canine piroplasmosis, together with observations upon the effect of drugs on *Piroplasma canis*. **Parasitology**, Cambridge, v. 2, n. 1-2, p. 156-191, 1909.

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

O'DWYER, L H; MASSARD, C L; SOUZA, J C P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. Hematological values of dogs naturally infected with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 125-129, 2000

OLIVEIRA, L.S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.3, n.2, p. 55-56, 2009.

OLIVEIRA, B.C.M. Detecção molecular de *Ehrlichia canis* em cães e em órgãos de seus respectivos carrapatos. 2016. 31p. Dissetação (Mestrado). **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Araçatuba, São Paulo. 2016.

OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B.; MCLEAN, R.; NDIRITU, C. G. Glomerular disease

associated with canine dirofilariasis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 1, p. 137-156, 1980.

OTTO, G.F.; MAREN, T.H. Filaricidal activity of someos organic antimony and arsenic compounds. **American Journal of Hygiene**, v. 46, n. 2, p. 244-245, 1947.

OTRANTO, D; DANTAS-TORRES, Filipe. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. ***Parasites & Vectors***, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2010.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BRIANTI, E.; TRAVERSA, D.; PETRIĆ, D.; GENCHI, C.; CAPELLI, G. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. **Parasites &Vectors**, v. 6, n.1, p. 32-38, 2013.

OTSUKA, H. Studies on transmission of *Babesia gibsoni* Patton (1910) by *Haemaphysalis longicornis* Neumann (1901). **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University**, v. 21, p. 359-367, 1974.

PAES-DE-ALMEIDA, E.C.A; FERREIRA, A.M.R; LABARTHE, N.V.; CALDAS, B. M.L.R. MCCALL, A. J.W. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with Dirofilaria immitis (Leidy, 1856) **Veterinary Parasitology** 113, p. 157–168, 2003.

PAES-DE-ALMEIDA, E. C**.** Avaliação histopatológica e ultra-estrutural do rim de cães naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)**.** 2000. 112 f. **Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2000**.**

PAULINO, P.G.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PECKLE, M.; COSTA, R.L.; VITARI, G.V.; VILELA, J.A.R.; ABREU, A.P.M.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil, **Preventive Veterinary Medicine,** v. 159, n. 1, p. 135-142, 2018a.

PAROLA, P.; CORNET, J. P.; SUKUMAN, C.; JITTAPALAPONG, S.; RAOULT, D. *Dermacentor auratus* Ticks as Potential Vectors of *Anaplasma platys* in Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, n. 1, p. 531-534, 2003.

PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. F. molecular detection of *Babesia canis vogeli* in cattle ticks (*Boophilus microplus*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.

PATTON, W. S. The development of *Babesia gibsoni* (Connal) in the ixodid tick *Haemaphysalis bispinosa*. **Scientific Memoirs by Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India**, n. 31, p. 1-32, 1910.

PENEZIĆ, A., MORIANO, R.; SPASIĆ, M.; ĆIROVIĆ, D. First report of a naturally patent infection with *Dirofilaria immitis* in an otter (*Lutra lutra*). **Parasitology Research**, v. 117, n. 3, p. 929-931, 2018.

PÉREZ-OSORIO, C.E.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J.E.; LÉON, J.J.A.; ZAVALA-CASTRO, J.E. *Rickettsia felis* as Emergent Global Threat for Humans. **Emerging Infectious Diseases,** v.14, n. 7, p.1019-1023, 2008.

PENZHORN, B. L. Don't let sleeping dogs lie: unravelling the identity and taxonomy of *Babesia canis*, *B. rossi* and *B. vogeli*. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, artigo 184, p. 1-9, 2020.

PÉREZ-TÁNOIRA, N.; GORDO, M.; GOMEZ-HERREROS, E.; PATIÑO, C.; REBOLLO, M.; ALARCÓN, A.; BUENO, M.; ROUX, V.; BREITSCHWERDT, E. B.; RAOULT, D. Molecular Survey of *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., and *Borrelia* spp. in Fleas and Lice in Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 5, p. 1034-1037, 2019.

PHILIP, C. B. Nomenclature of the rickettsiaceae pathogenic to vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 56, p. 484-494. 1953.

PHILIP, C. B., HADLOW, W. J. & HUGHES, L. E. *Neorickettsia helminthoeca*, a new rickettsia-like disease agent in dogs in western United States transmitted by an helminth. **Riass Commun VI Congr Int Microbiol, Roma**, v. 2, p. 256–257, 1953.

PUSTERLA, N.; HUDER, J. B.; LEUTENEGGER, C. M.; BRAUN, U.; MADIGAN, J. E.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1329-1331, 1999.

PURCHASE, H.S. Um método simples e rápido para demonstrar a presença de Rickettsia ruminatium (Cowdry, 1925) em cérebros de pacientes com doença do coração. **Veterinary Record** , v. 57, p. 413; 414, 1945.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES, D.S.; SOUZA, I.I.F.; ONO, T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.O.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 58-62, 2009.

RAMOS, R. A. N.; LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; GIANNELLI, Alessio; OTRANTO, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, v. 205, n. 1-2, p. 285–288, 2014.

RAMOS, R. A. N.; RAMOS, I. A. N.; FORNELANO, A. M.; SANTOS, M. A.; BRANDÃO, M. E.; DANTAS-TORRES, F.; ALVES, L. C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from Recife, Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 412-416, 2014.

RAMOS, R. A. N.; RAMOS, I. A. N.; SANTOS, M. A. L. S.; SOUZA, M. A.; CARVALHO, G. A.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. C. R.; VIEIRA, R. F. C.; ALVES, L. C. Molecular detection of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (sl) ticks from a Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 411-415, 2014.

RAPHAEL, U.B.; MEDEIROS, J.M.Q.; NOGUEIRA, A.C.J.; SILVEIRA, C.D.M.; SILVA,

R.R.F.; CARVALHO, K.S. Achado incidental de *Dirofilaria immitis* no estômago de cão. **V Simpósio de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesmac**, p. 14-15, 2015.

RAWLINGS, C. A. Effect of titiation of *Dirofilaria immitis* on the canine pulmonary artery. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 4, p. 550-555, 1980.

RAWLINGS, C. A.; CALVERT, C. A. Heartworm disease. In: ETTINGER, Stephen J. (ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. p. 1163-1184

RAYNAUD, J.P.; LAURENSON, G. L.; CARRE, J.L. Thiacetarsamide (adulticide) versus melarsomine (RM 340) (adulticide) in *Dirofilaria immitis* naturally infected dogs. **Annales de Recherches Vétérinaires**, Paris, v. 23, n. 4, p. 367-380, 1992.

REARDON, M.J.; PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems, **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 48-61, 1981.

REICHENOW, Eduard. Über die Unterscheidung der Babesia-Arten des Rindes. **Zeitschrift für Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere**, v. 47, p. 112-123, 1935.

RENÉ-MARTELLET1, M; MORO, C.M.; JEANNE CHÊNE, J.; BOURDOISEAU, G.; CHABANNE, L.; MAVINGUI, P. Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France**, BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 1-11, 2015.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T.; BONES, E. R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil**. Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 37, n. 2, p. 129-136, 2017.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.

RISTIC, M.; HOLLAND, C. J. Canine ehrlichiosis. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, v. 1, p. 278-286, 1993.

RISTIC, Miodrag. *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. 1. **ed. Boca Raton**: CRC Press, 1988.

RISHNIW, M.; BARR, S.C.; SIMPSON, K.W.; FRONGILLO, M.F.; FRANZ, M.; DOMINGUEZ, A.J.L. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 303-314, 2006.

ROETTI, C. Um surto de hidropericardite infecciosa (água do coração) em ovelhas. Journal: **Bollettino dell 'Istituto Sieroterapico Milanese**, v. 19, p. 108-114, 1940.

ROQUEPLO, C.; SANOGO, Y. O.; HOYAU, S.; MICHEL, G.; BEAUCHOUR, O.; DEVEAU, F. X.; ROCHE, C.; PARZY, D.; DAVOUST, B. Clinical, hematological and biochemical examinations in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis* in Senegal.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 32, n. 4, p. 305-312, 2009.

RUAS, J L; FARIAS, N A R; SOARES, M P; BRUM, J G W. *Babesia* sp. em graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*) no Sul do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 113-114, 2003.

RUST, M. K.; DRYDEN, M. W. The biology, ecology, and management of the cat flea. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 451-473, 1997.

RUST, Michael K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis (*cat flea) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 232-236, 2005.

SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 4, p. 382-384, 1999.

SAINZ, Á.; AMUSATEGUI, I.; MAZAGATOS, M. A.; TESOURO, M. Á. Clinical and hematological findings in canine ehrlichiosis induced by Ehrlichia platys. **Veterinary Clinical Pathology,** v. 28, n. 4, p. 121-125, 1999.

SAINZ, Á.; AMUSATEGUI, I.; MAÑAS, S.; TESOURO, M. Á. Effects of doxycycline on hematology and bone marrow of dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 243-253, 2000.

SAINZ, Á.l; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S.; SOLANO-GALLEGO, L. Guidelines for treatment, surveillance, and control of canine monocytic ehrlichiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 74-81, 2015.

SALIM, B.; ALANAZI, A. D.; OMORI, R.; ALYOUSIF, M.S.; ALANAZI, I. O.; KATAKURA, K.; NAKAO, R. Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. **Acta Tropica**, v. 193, p. 176-181, 2019.

SANOGO, Y.O.; DAVOUST, B.; INOKUMA, H.; CAMICAS, J.; BROUQUI, P. First detection of *Anaplasma platys* DNA in *Rhipicephalus sanguineus* using molecular techniques in Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, n. 1, p. 535-538, 2003.

SANTARÉM, V. A.; LAPOSY, C. B.; FARIAS, M. R. Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 2, p. 60-66, 2005.

SEBASTIAN, P.S.; SIERRA, R.M.; NEIRA, G.; HADIDI, J.; FLORES, F.S.; NAVA, S. Epidemiological link between canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* and the presence of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto in Argentina**. Parasitology Research**, v.120, n.1, p.725-729, 2021.

SCHAEFER, J. J.; KAHN, J.; MOROFF, R. I.; MARLARCHIK, J. A.; LORENTZEN, L. J.;

SHIELDS, J. F.; STINGLEY, J. L. Tick acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3394-3396, 2007.

SCHETTERS, T. P. M.; MOUBRI, K.; PRÉCIGOUT, E.; KLEUSKENS, J. A. G. M.; SCHOLTES, N. C.; GORENFLOT, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, n. 5, p. 485-493, 1997.

SERRA-FREIRE, N. M. Caso índice de Babesiose Humana no Rio de Janeiro. **Revista Uniabeu**, v. 7, n. 15, p. 76-85, 2014.

SHORTT, H. E. *Babesia canis*: the life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n. 2, p. 119-148, mar. 1973.

SILVA, C.B.; ALMEIDA, I.C.; VIEIRA, R. F. C.; JONGEJAN, F.; ALMOSNY, N. R. P.; LABRUNA, M. B.; BARROS-FILHO, I.G.; BALDANI, C. D. A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 5, p. 531-536, 2016.

SIMO, L.; KAZIMIROVA, M.; RICHARDSON, J.; BONNET, S. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission, **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n.281, p. 1-23, 2017.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vetor of *Ehrlichia platys*, **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n. 9, p. 1537 -1541, 1991

SIMPSON, C. F. Relationship of *Ehrlichia canis* to the host cell and effects of the organism on the tissue of dogs. **Anatomical Record**, v. 178, n. 2, p. 468-469, 1974.

SIMPSON, Charles F.; HARVEY, John W.; ASQUITH, Richard L.; GASKIN, Jack M.; JACKSON, Carol A. Inability to transmit *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus.* **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 11, p. 1904-1905, 1991.

SMITH, T.; KILBORNE, F. L. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington: U.S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Bulletin No. 1, Government Printing Office, 1893.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Desenvolvimento de *Ehrlichia canis*, agente causador da erliquiose canina, no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e sua diferenciação de uma riquétsia simbiótica. **American Journal de Veterinary Research,** v. 37, n.2, p. 119-126, 1976.

SNELLGROVE, A. N.; KRAPIUNAYA, I.; FORD, S. L.; STANLEY, H. M.; WICKSON, A. G.; HARTZER, K. L.; LEVIN, M. L. Vector competence of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto for Anaplasma platys. **Ticks and Tick-borne Diseases,** v. 11, n. 6, p. 101517, 2020.

SOARES, J. F.; VALADARES, R. B. N.; GERARDI, M.; DE PAULA, M.; LABRUNA, M. B.Vector competence of the tick *Amblyomma sculptum* for the bacterium *Rickettsia rickettsii*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, n. 4, p. 431-440, 2018

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats: expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 48-60, 2011.

SOULSBY, Ernest Jackson Lawson. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. *7.* ed. **London: Baillière Tindall**, 1982.

SOUZA, A. I.; DAGNONE, A. V.; SANTOS, R. M.; VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O. Prevalência da infecção por *Anaplasma platys* em cães de duas regiões do Brasil por meio de técnicas moleculares. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 231-236, 2004.

SOUZA, M. V.; GIANNICO, A. T.; RECHE JUNIOR, A.; SUCUPIRA, M. C. A.; MARCONDES, M.; PINTO, J. G. N. Alterações histopatológicas renais em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 487-493, 2010.

SPLITTER, E.J.; ANTHONY, H.D.; TWIEHAUS, M.J. Anaplasma ovis in the United States; experimental studies with sheep and goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 64, p. 487-491, 1956.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. **Manualde vigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004. p.62.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W & KONG, L.I. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and Miscelalaneous infections. In: ETTINGER, S.J. (ed): **Textbook of Veterinary Internal Medicine. Philadelphia**, W, b. Saunders Co, 1989, 265- 297p.

SZABÓ, M P J; PINTER, A; LABRUNA, M B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 27, p. 1-19, 2013.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 103-123, jan. 1991.

TENG, C.H.; PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.F. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein localized to the morula membrane. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2218-2225, 2003.

THEILER, A. Further investigations into Anaplasmosis of South African cattle. **First Report of the Director of Veterinary Research**, Pretoria, v. 1, p. 7-46, 1911.

THOMAS, A. D.; NEITZ, W. O. The importance of disease in wild animals. **South African Journal of Science**, v. 30, p. 419–425, 1933.

THOMAS, S. E.; WILSON, D. E.; MASON, T. E. Babesia, Theileria and Anaplasma spp. infecting sable antelope, Hippotragus niger (Harris, 1838), in southern Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 49, n. 3, p. 163-166, 1982.

TOCA, V.; MONROY, A. Determinación de la presencia de *Dirofilaria immitis* en cánidos y félidos silvestres del Club Auto Safari Chapín, Brito, Guanagazapa, Escuintla. (Tese de Doutorado). Universidad de San Carlos de Guatemala, 2017.

TOMASI, L.; SOUZA, A. I.; PEREIRA, W.L.O.; CARVALHO, F.; BENITES, N. C.; SILVA, J. R. Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Anaplasma platys* em cães submetidos a diferentes fatores ambientais no sul do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 4, p. 45-51, 2014.

TOLNAI, Z.; SZÉLL, Z.; SPROCHB, A.; SZEREDI, L.; T.SRÉTER, T. *Dirofilaria immitis*: an emerging parasite in dogs, red foxes and golden jackals in Hungary. **Veterinary parasitology**, v. 203, n. 3-4, p. 339-342, 2014.

TRANCOSO, T.A.L.; LIMA, N.C.; BARBOSA, A.S.; LELES, D.; FONSECA, A.B.M.; LABARTHE, N.V.; BASTOS, O.M.P.; UCHÔA, C.M.A. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in CaboFrio, RJ, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 1-12, 2020.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A.Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **VeterinaryParasitology**, v.140, n. 3, p. 223-230, 2006.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; AUTRAN DE MORAIS, H. S. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 177-180, oct. 2006.

TROTTA, M.; CARLI, E.; NOVARI, G.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 318-322, 2009.

TROTTA, M.; CARLI, E.; FURLANELLO, T.; CALADIN, M.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in a Leishmania infantum naturally co-infected dog with a severe polyarthritis. **Veterinary Rheumatology**, v. 1, n. 1, p. 11-15, 2009.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 2, p. 405-418, 1990.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F. F. J.; PERIÉ, N. M.; SPANJER, A. A. M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, v. 11, n. 1, p. 33-40, 1989.

UILENBERG, G. *Babesia* — A historical overview. **Veterinary Parasitology,** v. 138, n. 1-2, p. 3-10, may 2006.

UILENBERG, G. Intregetation of the transmission of *Babesia canis* by *Rhipicephalus sanguineus*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 11, p. 1133-1142, 2000.

VERCAMEN, F.; DE DEKEN, R. Haematological and biochemical profile in experimental

canine babesiosis. **Medicina Veterinaria**, v. 12, p. 156-161, 1997.

VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R.; MAES, R. Prophylactic and therapeutic activity of doxycycline against *Babesia canis* in dogs. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Berlin, v. 43, n. 1-10, p. 55-60, 1996.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. *MedVep* - **Revista Científica de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 2, n. 7, p. 143-153, 2004

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.A.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.; MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O.Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p.1–12, 2011.

VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, Heinz; MENCKE, N. The feline leukemia virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Parasitology Research**, v. 90, supl. 3, p. 132-134, 2003.

WAMWAYI, H. M.; KARIUKI, D. P.; WAFULA, J. S.; ROSSITER, P. B.; MBUTHIA, P. G.; MACHARIA, S. R. Observations on rinderpest in Kenya, 1986-1989. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties,** v. 11, n. 3, p. 769-784, sep. 1992.

WATANANG, S.; TANGKNAKUL, C.; TIYAPUNTPONG, S.; BOONYAPIPAT, P.; SIRIPOONSAP, J. Hematological and biochemical alterations in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **The Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 40, n. 4, p. 964-971, 2006.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization the of subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagles dogs, **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3, p. 307-317, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WOOD, John C. The activity of imidocarb against *Babesia* infections of cattle. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 25, p. 254-257, 1971.

WOODY, B. J. & HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs**. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n.1, p. 75–98, 1991.

WULANSARI, R; WIJAYA, A; ANO, H; HORII, Y; NASU, T; TOKUNAGA, S; AGUNGPRIYONO, S; MAKIMURA, S. Lymphocyte subset and specific IgG antibody levels in clindamycin-treated and untreated dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 579-584, May 2003.

YABSLEY, M.J.; McKIBBEN, J.; THOMAS, R.E.; PELS, M. E.; REEVES, W.K.; CHANDRASHEKAR, R.; STARKEY, M.A.; KAMER, K.; PATTERSON, G.T.;

GALLAGHER, T.; O'CONNOR, J. T.; LOFTON, K.; TRENTON, J.; GONZALEZ, C.A. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology,** v. 151, n. 2-4, p. 279-285, 2008.

YAP, S-Fatt; TAN, S. M.; CHAN, C. H.; LIM, L. S. A single tube nested PCR for the detection of hepatitis C virus RNA. **Journal of Virological Methods**, v. 49, n. 1, p. 119-123, 1994.

YOUNAN, M.; OUSO, D.O.; BODHA, B.; KEITANY, E.; WESONGA, H.O.; SITAWA, R.; KIMUTAI, J.; KURIA, W.; SORI, S.W.; SVITEK, N.; LANDMANN, T.; WAKO, D.D.; VILLINGER, J. *Erhlichia* spp. próximo a *E. ruminantium*, *E. canis* e " *Candidatus Ehrlichia regneryi*" ligados a doenças semelhantes às do coração em camelos quenianos (Camels *dromedarius*) **Tropical Animal Health and Production,** v.53, n. 147, p. 12 – 24, 2021.

YU, X.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; WALKER, D. H. Characterization of *groEL* gene sequences of *E. canis* and *E. chaffeensis* and comparison with other members of the family Anaplasmataceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4001-4006, 2001.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 241-248, 2000.

ZAHLER, M.; SCHEINE, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, v. 84, n. 7, p 544-548, 1998.

CAPÍTULO I

ASPECTOS LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS ASSOCIADOS À HEMOPARASITOS DAS FAMÍLIAS BABESIIDAE E ANAPLASMATACEAE EM CÃES ATENDIDOS EM UNIDADES PRIVADAS DE SAÚDE ANIMAL

RESUMO

As hemoparasitoses de cães atendidos em unidade privadas de saúde animal (U.P.S.A.) representam enfermidades parasitárias de grande relevância, por apresentar prevalência de caráter endêmico. Além de aspectos clínicos e laboratoriais inespecíficos fazem com que o diagnóstico seja limitado e desafiante para a clínica médica, que na maioria das vezes utiliza como única alternativa, diagnóstico presuntivo associado à terapia empírica. Com objetivo de avaliar se os aspectos laboratoriais e epidemiológicos são capazes de auxiliar no diagnóstico das hemoparasitoses em cães, foi realizado um estudo retrospectivo transversal analisando a prevalência e os possíveis fatores associados para a sua ocorrência. Foram utilizados mil e quinhentos prontuários e consideradas como variáveis resposta quatro grupos de animais: suspeitos de hemoparasitoses (GI), positivos para hemoparasitos (GII), positivos para hemoparasitos da família Babesiidae (GIII) e hemoparasitos da família Anaplasmataceae (GIV) e as variáveis explicativas (sexo, idade, raça, porte, presença de carrapatos e alterações laboratoriais). Foram realizadas análises estatísticas exploratórias univariadas, e análises bivariadas e multivariadas, baseadas em modelos de regressão logística, para verificar quais os fatores associados aos desfechos em estudo. Dos prontuários analisados, 241 (16,1%) foram considerados suspeitos e 146 (9,7%) com diagnóstico positivo para pelo menos um hemoparasito por esfregaço sanguíneo. Desses animais 47 (32,2%) apresentavam agentes da família Babesiidae e 99 (67,8%) agentes da família Anaplasmataceae. Foi verificado que a presença de carrapato foi associada ao diagnóstico para a família Babesiidae, visto que animais com este ácaro apresentaram 2,7 vezes maior risco de infecção para este agente (RP = 2,7 [IC 95%: 1,5; 4,8]). Outra variável relacionada com este protozoário foi anemia; que apresentou 1,3 vezes maior chance do cão estar infectado (RP:1,3 [IC 95%: 1,1; 1,7]). Da mesma forma, cães de grande porte apresentaram 2,9 vezes maior chance de estar infectado por bactérias da família Anaplasmataceae (RP:2,9[IC95%:1,7;4,7]) e com monócitos ativados apresentaram 2,3 vezes maior chance de estar infectado por esta bactéria (RP:2,3 [IC 95%: 1,5; 3,6]). Entretanto a variável com maior influência no diagnóstico positivo para a família Anaplasmataceae foi a trombocitopenia.Cães trombocitopênicos apresentaram 8,2 vezes maior chance de estar infectado por estas bactérias (RP:8,2 [IC 95%: 4,8; 13,9]). Os resultados indicam que animais de grande porte, trombocitopêncios e com monócitos ativados estão associados a infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp., enquanto presença de carrapatos e anemia estão associados a família Babesiidae.

Palavras-chave: Epidemiologia, fatores associados, cães, *Babesia* spp., *Anaplasma* spp.

ABSTRACT

Hemoparasitos is in dogs treated at small animal clinics represents the main parasitic disease, as it has a relevant prevalence and is endemic in nature. In addition to nonspecific clinical and laboratory aspects, the diagnosis is limited and challenging for the medical clinic, which most often uses the presumptive diagnosis associated with empirical therapy as the only alternative. In order to assess whether laboratory and epidemiologicalaspectsareabletoassistinthediagnosis of hemoparasitosis in dogs, a retrospective cross-sectional study was carried out analyzing the prevalence and possible associated factors for its occurrence. One thousand and five hundred medical records were used and four groups of animals were considered as response variables: suspected of hemoparasites (GI), positive for hemoparasites (GII), positive for hemoparasites of the Babesiidae family (GIII) and hemoparasites of the family Anaplasmataceae (GIV) and the variables explanatory (sex, age, race, size, presence of ticks and laboratory alterations). Explanatory univariate analysis and bivariate and multivariate analyzes were performed, based on logistic regression models, to verify the factors associated with the out come sunderstudy.Of the medical records analyzed, 241 (16.1%) were considered suspicious and 146 (9.7%) with a positivediagnosis for at least one hemoparasite. Ofthese animals 47 (32.2%)had agents from the Babesiidae family and 99 (67.8%) agents from the Anaplasmataceae family. It was found that the presence of ticks was associated with a positive diagnosis for the Babesiidae family, since animals with the presence of this mite had a 2.7 times higher risk of infection for this agent (PR = 2.7 [95% CI: 1.5; 4.8]). Another variable related to this protozoan was anemia; presented a 1.3 times higher risk of infection (PR = 1.3 [95% CI: 1.02; 1.7]). Likewise, large dogs presented 2.9 times greater risk of infection for the family Anaplasmataceae (PR = 2.9 [95% CI:1.7;4.7]).However, the variable with the greatest influence on the positive diagnosis for the family Anaplasmataceae, was thrombocytopenia. Thrombocytopenic dogs had an 8.2 times higher risk of infection with these bacteria (PR = 8.2 [95% CI: 4.8; 13.9]). The results indicate that large animals, thrombocytopenia with activated monocytes are associated with infection by *Ehrlichia* spp and *Anaplasma* spp., while the presence of ticks and anemia are associated with the Babesiidae family.

Keywords: Veterinary epidemiology, animal parasitology, associated factors, *Babesia* spp., *Anaplasma* spp.

1 INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses que acometem os cães são doenças causadas por agentes intracitoplasmáticos obrigatórios que parasitam células do sistema hematopoiético (RIKHISA, 1991; ELIAS, 1991; DUMLER et al. 2001). São diagnosticadas com grande frequência na rotina médico veterinária, sendo responsáveis por manifestações clínicas variáveis, desde imperceptíveis até quadros clínicos mais graves resultando em óbito (LABARTHE et al., 2003).

Os principais agentes responsáveis por maior ocorrência de hemoparasitoses na clínica de pequenos animais estão compreendidos em duas famílias: Anaplasmataceae, representados pelas espécies *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* (DUMLER et al., 2001; DUMLER et al., 2005) e Babesiidae pela espécie *B.vogeli* (JOJIMA et al., 2008; VILELA et al., 2013) A primeira família é representada por bactérias pleomórficas, cocoides, gram-negativas do gênero *Ehrlichia* que infecta monócitos, macrófagos e células da linhagem mieloblástica e *A. platys* que infecta mais comumente plaquetas podendo eventualmente infectar leucócitos (HARVEY et al., 1978; ALMOSNY, 2002; DUMLER et al. 2005; MYLONAKIS et al. 2010). A segunda família representada por protozoário da subespécie *B. vogeli* infecta exclusivamente eritrócitos sendo a principal espécie reportada em cães no Brasil (VILELA et al. 2013) e com maior prevalência (JOJIMA et al., 2008).

A ehrlichiose monocítica canina (EMC) é uma doença potencialmente fatal, causada por *E. canis*, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.)* (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005). Foi primeiramente descrita na Argélia em 1935, mas tornou-se relevante ganhando importância reconhecida pelos EUA quando causou altas taxas de mortalidade aos cães americanos levados a Guerra do Vietnã em 1962 (ALMOSNY, 1998). Atualmente tem distribuição nos diversos continentes, afetando comumente cães em áreas de clima quente (COHN, 2003) é considerada endêmica em muitas regiões (SANTOS et al., 2009). A transmissão vetorial é relatada, sendo a presença de cães infectados necessário para a permanência de *E. canis*, visto que não há transmissão vertical em carrapatos (NEER, 1998). Assim, a incidência de infecção está intimamente relacionada à abundância do vetor (TRAPP et al., 2006). No Brasil, o *R. sanguineus (s.l.)* é o principal vetor nas áreas urbanas, sendo este bem adaptado ao ambiente doméstico, entretanto pouco se conhece sobre a transmissão em áreas rurais onde carrapatos do gênero *Amblyomma* são encontrados com maior frequência que o *R. sanguineus (s.l.)* (LABRUNA; PEREIRA,

2001;LABRUNA et al., 2007).

A trombocitopenia infecciosa cíclica canina causada por *A. platys*, foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1978 (HARVEYet al., 1978) e, posteriormente, no Japão (INOKUMA et al., 2003). Este agente infecta especificamente plaquetas de cães e causa uma enfermidade caracterizada pela diminuição de plaquetas persistindo por 7 a 10 dias, seguida por um período de recuperação. *A. platys* causa parasitemia e trombocitopenia cíclica em intervalos de 10 a 14 dias. Alguns dias após a infecção ocorre uma diminuição brusca no número de plaquetas e *A. platys* desaparecendo da circulação (INOKUMA et al. 2002). A detecção de carrapatos do gênero *R. sanguineus (s.l.)* infectados com *A. platys* sugere ser este o vetor deste agente etiológico (HOSKINS, 1993; MOTOI et al. 2001), mas ainda não foi possível comprovar experimentalmente a sua transmissão (SIMPSON et al., 1991; BREITSCHWERDT, 2004).

A babesiose canina é uma doença transmitida por carrapatos, causada por hematozoários do gênero *Babesia,* e apresenta como agentes etiológicos espécies, que variam em função do vetor, patogenicidade e localização geográfica: *B. canis*, *B.vogeli e B. rossi* (UILENBERG et al. 1989) e *Babesia gibsoni*. No Brasil, destaca-se *B.canis*, sendo *B.vogeli* a principal espécie que acomete os cães (JOJIMA et al., 2008; VILELA et al., 2013),

Babesia gibsoni já foi identificada no Brasil (TRAPP et al. 2006; JOJIMA et al.2008). A espécie *B. rossi* é transmitida pelo *Haemaphysalis leachi* descrita na África do Sul sendo a cepa considerada mais patogênica (TABOADA, 1998). A espécie *B. vogeli* diagnosticada no Rio de Janeiro, acomete cães com frequência de 11,9%, sendo um importante patógeno subdiagnosticado, principalmente por complicações em coinfecções e por ter sinais clínicos comuns a outras doenças (VILELA et al. 2013). Já *B. gibsoni*, é endêmica no sudeste da Ásia, América do Norte (BIRKENHEUER et al., 2005) e Austrália (JEFFERIES et al., 2007) e os sinais clínicos da infecção são variáveis. Em alguns casos, a doença é fulminante com falência múltipla de órgãos e morte (REDDY et al., 2014).

Babesia vogeli ocorre mundialmente com alta prevalência nas regiões tropicais e subtropicais acometendo espécies de canídeos domésticos e silvestres. No Brasil, a doença é de grande importância veterinária pelo seu caráter endêmico e prevalência crescente em diversas áreas. Este fato tem associação direta com a elevada distribuição do carrapato vetor *R. sanguineus (s.l.),* cuja prevalência e intensidade de infestação vêm aumentando em cães de diferentes regiões do país (DANTAS-TORRES,2008). Essas hemoparasitoses podem apresentar diversas alterações hematológicas e bioquímicas no seu hospedeiro. Os animais infectados por *E. canis* podem apresentar trombocitopenia, anemia e leucopenia (MOREIRA

et al., 2003, SANTOS et al., 2009). No caso de infecções por *A. platys*, pode ocorrer anemia moderada e quedas temporárias no valor total de leucócitos, além de variações cíclicas na contagem de plaquetas (HARVEY et al., 1978). Os animais acometidos por *B. vogeli* podem desenvolver anemia discreta agrave, reticulocitose, policromasia, macrocitose, linfocitose discreta e hiperbilirrubinemia dependendo de sua forma aguda ou crônica (STOCKHAM; SCOTT, 2008).

A prevalência de hemoparasitoses em cães possui variações em função de diversos fatores, principalmente de acordo com o método de diagnóstico utilizado.Com a utilização do diagnóstico parasitológico (exame direto de esfregaço sanguíneo) a prevalência varia entre 0,0 a 50,5% (ALBERNAZ et al., 2007; MENESES et al., 2008; NAKAGHI et al.,2008; CARLOS et al., 2011; LEMOS et al., 2012; LEAL et al., 2015; ROTONDANO et al., 2015; ARAÚJO et

al., 2015). Já com a utilização do diagnóstico molecular (PCR, *n*-PCR, *q*-PCR e *sn*-PCR) a prevalência encontra-se entre 0,0 a 65,0% (MENESES et al., 2008; NAKAGHI et al., 2008; DAGNONE et al., 2009; UENO et al., 2009; RAMOS et al., 2009; LEMOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SOUSA et al., 2013; VILELA et al., 2013; MORAES et al., 2014; GUEDES et al., 2015; ROTONDANO et al., 2015; GOTTLIEB et al., 2016; SOARES et al., 2017; ROTONDANO et al., 2017).

Sendo que, como emprego de metodologias de diagnóstico indireto (RIFI, ELISA, dot-ELISA, SNAP 3Dx e SNAP 4Dx Plus), a prevalência varia entre 4,4 a 94,8% (OLIVEIRA et al., 2000; NAKAGHI et al., 2008; FURUTA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; KRAWCZAK et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SPOLIDORIO et al., 2013; PAULAN et al., 2013, GIRARDI et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; COSTA et al., 2015; GUEDES et al., 2015; ROTONDANO et al., 2015; GOTTLIEB et al., 2016).

Entretanto, essas variações encontradas nos diversos estudos, também podem ser explicadas em razão das condições epidemiológicas da região, distribuição geográfica do vetor, além de aspectos intrínsecos aos cães relacionados com a fase da doença em que foi realizado o exame, como uma das causas principais, propiciando ou não a expressividade da prevalência (MOREIRA et al.,2003; MOREIRA et al.,2005; FERREIRA et al.,2007; RAMOS et al.,2009; SANTOS et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015).

Nas últimas décadas, as hemoparasitoses têm ganhado importância na Clínica Veterinária de Pequenos Animais, devido a um aumento do número de cães como animais de companhia, atrelado a perfeita adaptação do principal carrapato vetor destes agentes, *R. sanguineus (s.l.)*, ao ambiente domiciliar e peridomiciliar dos locais onde os animais são

criados (LABRUNA et al., 2000). É válido lembrar que cães de áreas urbanas, que vivem restritos aos domicílios, tem sua ixodofauna representada quase que exclusivamente por *R. sanguineus*(*s.l.*)Latreille,1806(RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA et al.,2001; SZABÓ et al., 2001; SOARES et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012; ALMEIDAet al., 2013; COSTAet al., 2015).

Riphicephalus sanguineus (s.l.) é um carrapato com distribuição geográfica ampla e tem sido incriminado como vetor de vários patógenos que podem infectar animais e humanos: *Rickettsia conorii* (PALMAS et al., 2001); *R. rickettsii* (PIRANDA et al., 2011); *Coxiella burnetti* (DUMLER et al., 2005); *Hepatozoon canis* (GIANNELLI et al., 2013); *B. vogeli* (COSTA-JÚNIOR et al.,2009); *B.gibsoni* (JOJIMA et al.,2008) *B.conradae* (KJEMTRUP et al.,2006); *E. chaffeensis* (DUMLER et al., 2005); *E. canis* (SMITH et al., 1976); *E. ewingii* (LITTLE, 2010); *A. platys* (FRENCH; HARVEY, 1983); *A. phagocytophilum* (SANTOS et al., 2013) e *Leishimania* spp.(COUTINHO et al., 2005; VIOL et al., 2016).

Os cães atualmente estão inseridos no ambiente familiar e segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), neste contexto há um maior número de animais em comparação com o número de humanos, que em contato com esses animais considerados reservatórios e sentinelas de diversos patógenos, estão sujeitos a infecção por esses agentes zoonóticos, devido maior exposição aos seus respectivos vetores (BEALL et al., 2012; VIEIRA et al., 2013; LUZ et al., 2014; BANETH et al., 2016).

Poucos estudos epidemiológicos com hemoparasitos na população canina vêm sendo conduzidos com o intuito de correlacionar fatores de riscos e alterações laboratoriais associados à transmissão destes agentes (BORIN et al., 2009), assim também que, uma vez que alguns desses agentes podem infectar humanos (PEREZ et al., 2006; VIEIRA et al., 2011; BENIGNO et al., 2011; BANETH et al., 2016).

Assim com base em prontuários médicos veterinários de U.P.S.A., buscou-se verificar dados laboratoriais e epidemiológicos que poderão auxiliar na profilaxia e controle das hemoparasitoses no ambiente urbano e determinando a sua prevalência e elucidando os possíveis fatores clínicos e laboaratoriais associados encontrados em cães.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem dos dados

O número mínimo de prontuários foi determinado pela fórmula $n= z^2_{\alpha/2}P (1 - P) / d^2$ segundo Medronho et al. (2009). Onde n = Amostra; $z_{\alpha/2}$ = 1,96 (valor da distribuição normal

padronizada); P = prevalência esperada d² = erro tolerável de 5%. A prevalência esperada utilizada foi (50%) de acordo com a seleção por conveniência, já que haviam poucasreferências sobre a prevalência de hemoparasitos em cães na área de estudo foram selecionados 1500 prontuários de atendimento médico veterinário durante o período compreendido de janeiro de 2014 a dezembro de 2019. Os prontuários pertenciam aos arquivos de duas unidades privadas de saúde animal (UPSA) localizadas em bairros da Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Desta forma foram separados em UPSA-1, abrangendo os bairros de Bangu, Realengo, Padre Miguel e Deodoro; e UPSA-2, abrangendo os bairros de Campo Grande e Inhoaíba. Nas UPSAs os prontuários estavam organizados em ordem alfabética pelo nome dos tutores dos animais, sendo a escolha de forma aleatória sistematizada, para cada dez prontuários manualmente contabilizados apenas um era selecionado (MEDRONHO et al., 2009).

2.2. Variáveis do estudo

Quatro grupos de animais foram analisados, sendo estes: Grupo I (GI), animais suspeitos de hemoparasitoses foram aqueles que apresentavam no mínimo 3 sinais e/ou sintomas sugestivos de hemoparasitose (cães com presença de carrapato, tempo de perfusão capilar (TPC) menor que 2 segundos, convulsões, mucosas hipocoradas, epistaxe, hematemese, hematoquezia, esplenomegalia, hepatomegalia, apatia, anorexia e febre) (ALMOSNY, 2002); Grupo II (GII), animais com diagnóstico positivo por exame direto de esfregaço sanguíneo para pelo menos um hemoparasito; Grupo III (GIII), animais com diagnóstico positivo por exame direto de esfregaço sanguíneo para agentes da família Babesiidae e Grupo IV (GIV), animais com diagnóstico positivo por exame direto de esfregaço sanguíneo para agentes da família Anaplasmataceae.

Todas as variáveis testadas foram categorizadas como: idade de acordo com as categorias, ou seja, filhotes (<1ano), adultos (1 a 8anos) e idosos (>8anos), com exceção do sexo que já é categorizado por natureza.

Para a variável raça, foi estabelecido um número mínimo de cães sendo eliminada das análises aquelas raças cujo número de cães foi inferior a 30 animais (SAMPAIO, 2004). As raças que se enquadraram nesta categoria estão listadas na Tabela 1. A variável porte foi incorporada nas análises, contendo os animais com raça definida (CRD) e sem raça definida (SRD), sendo os de pequeno porte as raças: Pinscher, Poodle, Yorkshire e Dachshund; de médio porte: SRD, American Pitt Bull Terrier (Pitt Bull) e Cocker Spaniel Inglês e os cães grande porte: Pastor Alemão, Labrador e Rottweiler. Para a variável Área foi necessário

aruparalgunsbairros para formar três grupos distintos com características geográficas semelhantes: Área 1, composta pelo bairro Bangu; Área 2, compreendendo os bairros Campo Grande e Inhoaíba e Área 3, pelos bairros de Padre Miguel, Realengo e Deodoro. Na tabela 1 estão assinaladas as variáveis explicativas com os seus respectivos totais de acordo com cada grupo analisado. A categoria "Outros" (N=199) não foi incluída nas análises nem nas tabelas por compreender o total de raças que obtiveram número inferior a 30 cães em cada categoria, inviabilizando as análises estatísticas (SAMPAIO, 2004)

Para as variáveis laboratoriais, foram categorizadas em presença ou ausência de alterações hematológicas como: leucocitose, leucopenia, linfocitose, linfopenia, eosinofilia, eosinopenia, neutrofilia, neutropenia, monocitose, monocitopenia, trombocitopenia, monócitos ativados e anemia. (KANEKO et.al., 1997). Para a realização dos modelos multivariados, algumas variáveis não puderam ser analisadas em conjunto devidas multicolinearidade existente entre elas, logo a variável raça foi excluída em detrimento do porte quando este foi analisado e vice-versa da mesma forma área em detrimento da UPSA. Devido a colinearidade, como cada variável porte é composta por várias raças no momento da análise haveria erro e duplicidade de variáveis no modelo por isso foram analisadas separadamente, quando raça era analisada no modelo o porte não entrava na análise. O mesmo foi feito com a ÁREA e a UPSA, visto que cada UPSA compreende várias ÁREAS do estudo.

2.3. Análise dos dados

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados para verificar prevalência de hemoparasitos, com correspondentes intervalos de confiança (IC95%), considerando todas as variáveis explicativas (sexo, idade, raça, porte do animal, presença de carrapato, alterações laboratoriais, unidades de atendimento. Para a variável UPSA-1foram agrupados os bairros de Bangu, Realengo, Deodoro e Marechal Hermes sendo mais próximos e que apresentaram as temperaturas mais quentes da zona oeste e na UPSA-2 foram agrupados o bairro de Campo Grande e de Inhoaíba que apresentam as temperaturas mais amenas e possuem cobertura vegetal segundo Costa; Moura (2003) e Lucena (2010) para os grupos GI, GII, GIII e GIV.

Em seguida, foram realizadas análises bivariadas e multivariadas com objetivo de verificar as possíveis associaçõesentre as variáveis desfecho e as variáveis explicativas. A medida de associação epidemiológica, razão de prevalência (RP) foi estimada para cada variável de exposição, entre elas variáveis epidemiológicas e clínicas, com objetivo de mensurar um potencial fator de risco que a mesma oferece para o(s) desfecho(s) em questão.Para estimar

as razões de prevalência (RP), foram ajustados modelos de regressão logística, utilizando como funçao de ligação a função logarítmica, utilizando dessa forma a Razão de Chances (OR) como estimativa para a Razão de Prevalência (RP) e seus correspondentes intervalos de confiança (IC) a 95%, visto que se trata de um estudo transversal. (BARROS; HIRAKATA, 2003).

A seleção das variáveis de exposição para o ajuste do modelo multivariado foi feita através das análises bivariadas, sendo selecionadas as variáveis que foram significativas (*p-valor* <0,05) para serem incluídas no modelo.

Na análise das variáveis laboratoriais, não foram consideradas como variáveis de exposição, as variáveis clínicas são potencialmente associadas com a presença de hemoparasitos e as variáveis laboratoriais não são preditoras de presença de hmeoparasitos, mas sim uma consequência de presença dos hemoparasitos causando hemoparasitoses.

Para diagnosticar o modelo mais parcimonioso, foram estimados os valores do Critério de Informação de Akaike (AIC) para cada modelo multivariado (AKAIKE, 1974). Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico R versão 3.6 (R CORE TEAM, 2019).

3 RESULTADOS

É possível observar na tabela 1, que dentre os 1.500 prontuários analisados, 241/1500 (16,1%) dos cães foram considerados suspeitos de hemoparasitose e 146/1500 (9,7%) obtiveram diagnóstico positivo para pelo menos um tipo de hemoparasito. Dos animais positivos, 47/146 (32,2%) foram por agentes da família Babesiidae e 99/146 (67,9%) por agentes da família Anaplasmataceae. Em todos os grupos GI, GII, GIII e GIV) o sexo e a idade não foram considerados determinantes para à infecção por hemoparasitos (Tabela 1) Entretanto, quando o sexo foi avaliado dentro da categoria da variável raça, somente as fêmeas de Pastor Alemão (27,80%) obtiveram valor expressivo para justificar maior prevalência de parasitismo na família Anaplasmataceae (Tabela 2).

Ainda na tabela 1, a variável raça, quando analisada com duas categorias CRD e SRD também não apresentaram diferença entre os grupos . A variável porte não apresentou diferença no parasitismo quando analisada no GI, GIII e GIV, enquanto no GII houve diferença entre as categorias grande e pequeno porte. Quando a raça foi analisada dentro da categoria “CRD” no GI não houve diferença, sendo a raça com maior prevalência foi o Daschund (30,4%), já no GII foi observado maior prevalência para o Rottweiler (19,6%).

Tabela 1. Análise univariada da prevalência (P) e intervalosde confiança (IC 95%), de cães

positivos para hemoparasitos com ênfase em agentes da família Babesiidae e Anaplasmataceae e variáveis epidemiológicas em prontuários de Unidades Privadas de Saúde Animal do município do Rio de Janeiro, Brasil.

VARIÁVEIS EXPLICATIVAS	N	GI	GII	N	GIII	GIV
		P(%)[IC95%]	P(%)[IC95%]		P(%)[IC95%]	P(%)[IC95%]
TOTAL	1500	16,1[14,2;17,9]	9,7[8,2;11,2]	146	32,2[24,6;39,8]	67,8[60,2;75,4]
SEXO						
Macho	812	15,9[13,4;18,4]	9,9[7,9;12,0]	65	35,4[23,8;47,0]	70,4[60,4;80,3]
Fêmea	688	16,3[13,5;19]	9,4[7,3;11,6]	81	29,6[19,7;39,6]	64,6[52,9;76,2]
IDADE						
SI	110	15,5[8,7;22,2]	7,3[2,4;12,1]	8	37,5[3,9; 71]	62,5[28,9;96]
<1 ano	382	13,1[9,7;16,5]	9,7[3,8; 8,7]	37	35,1[19,7;50,5]	64,9[49,5;80,2]
1-8anos	554	17,7[14,5;20,9]	7,8[5,5; 9,9]	62	30,6[19,2; 4,9]	69,3[57,9;80,8]
>8 anos	454	16,7[13,3;20,2]	5,9[3,8; 8,1]	39	30,8[16,3;45,2]	69,2[54,7;83,7]
PORTE						
Grande	124	18,5[11,7;25,4]	14,5[8,3;20,7]	18	22,2[3; 41,4]	77,8[58,6;96,9]
Médio	656	16,8[13,9;19,6]	9,6[7,3;11,8]	63	39,7[27,6;51,8]	60,3[48,2;72,4]
Pequeno	521	14,8[11,7;17,8]	6,1[4,1; 8,2]	32	28,1[12,5;43,7]	71,9[56,3;87,4]
RAÇASMISTAS						
SRD	551	16,8[13,7;20]	10,2[7,7;12,7]	56	39,3[26,5;52,1]	60,7[47,9;73,5]
CRD	949	15,6[13,3;17,9]	9,2[7,6;11,3]	90	27,8[18,5;37]	72,2[62,9;81,5]
RAÇASPURAS						
Rottweiler	46	17,4[6,4;28,3]	19,6[8,1; 31]	4	20[0;55,1]	75[32,6;117,4]
PastorAlemão	40	17,5[5,7;29,3]	12,5[2,2;22,7]	6	50[10;90]	50[10;90]
Labrador	38	21,1[8,1;34,1]	10,5[0,8;20,3]	5	0 [0;0]	0 [0;0]
CockerSpaniel	73	15,1[6,9;23,3]	8,2[1,9;14,5]	1	0 [0;0]	0 [0;0]
Poodle	334	15[11,4;18,8]	6,9[4,2; 9,6]	23	17,4[1,9;32,9]	82,6[67,1;98,1]
Yorkshire	44	18,2[6,8;29,6]	6,8[0,6;14,2]	3	66,7[13,3; 120]	0[0; 86,7]
Pinscher	106	8,5[3,2;13,8]	5,7[1,3;10]	6	50[10;90]	50[10;90]
Pitt Bull	32	18,8[5,2;32,3]	3,1[2,9; 9,1]	1	0[0;0]	0[0;0]
Daschund	37	30,4[11,6;49,2]	0 [0]	9	33,3[2,5;64,1]	66,7[35,9;97,5]
CARRAPATO						
presente	264	28[22,6;33,4]	14,4[10,1;18,6]	38	44,7[28,9;60,5]	21,2[13,2;29,3]
ausente	1236	13,5[11,6;15,4]	8,7[7,2;10,3]	108	27,8[19,3;36,2]	78,8[70,7;86,8]
AREA						
A1	1036	18,3[16,0;20,7]	11,9[10;13,9]	124	36,6[24,4;47]	70,2[62,1;78,2]
A2	285	11,2[7,6;14,9]	5,3[2,6; 7,8]	285	24,5[6,5;42,4]	53,3[28,1;78,6]
A3	179	10,6[6,1;15,1]	3,9[1,1; 6,7]	179	16,7[2; 35,6]	57,1[20,5;93,8]

S.I.= Sem informação de idade; S.R.D.= Sem Raça Definida; C.R.D. = Com Raça Definida = União de todas as raças puras; A1, A2 e A3 = áreas de residência dos animais incluídos nas UPSA.

Tabela 2. Análise da prevalência de agentes da família Babesiidae (GIII) e Anaplasmataceae (GIV) em cães considerando sexo (macho ♂, fêmea ♀) dentro das categorias da variável raça e m unidades privadas de saúde animal da zona oeste do Rio de Janeiro (2014 – 2019).

RAÇAS	N	GIII		GIV	
	(♂ /♀)	P♂ (%)	P♀ (%)	P♂ (%)	P ♀ (%)
Cocker Spaniel	40/33	7,5	0,0	7,5	0,0
Rottweiler	32/14	3,1	14,3	15,6	7,1
Labrador	21/17	0,0	5,9	9,5	5,9
SRD	308/243	3,9	4,1	7,5	4,5
Dachshund	22/15	0,0	0,0	0,0	0,0
PittBull	17/15	0,0	0,0	0,0	6,7
Yorkshire	25/19	0,0	10,5	4	0,0
Poodle	170/164	1,2	1,2	5,9	5,5
Pastor Alemão	22/18	0,0	0,0	0,0	27,8 *
Pinscher	52/54	3,8	1,8	5,8	0,0

(*) *p-valor* < 0,05

Ao ser analisada no GIII não houve diferença estatística entre as categorias analisadas, sendo a mais prevalente a raça Yorkshire (66,7%). Ao finalizar sua análise no GIV não houve diferença significativa entre as raças sendo o Poodle (82,6%), a raça mais prevalente no parasitismo. Foi observado um grande número de raças com ausência de parasitismo no GIII (Labrador, Cocker Spaniel Inglês, Pitt Bull e Daschund) e no GIV (Labrador, Cocker Spaniel Inglês, Yorkshire, Pitt Bull e Daschund)).

A presença de carrapato teve relação com o parasitismo somente no grupo de animais suspeitos (GI) e positivos para agentes da família Babesiidae (GIII). A variável Área foi determinante na expressividade do parasitismo em ambos os grupos GI e GII, havendo diferença significativa somente da área A1 em relação às áreas A2 e A3 respectivamente (Tabela 1).

Na Tabela 3, ao analisarmos o GI, somente os animais com presença de carrapato e residentes na área A1 apresentaram maior risco de serem infectados por hemoprasitos. Entretanto, no GII animais de médio e grande porte, com presença de carrapato e residentes na área A1 apresentaram maiores riscos de serem positivos para pelo menos um tipo de hemoparasito. No GIII somente animais de porte médio e com presença de carrapato apresentaram mais chances de infecção por membros da família Babesiidae. Já no GIV somente animais de grande porte e residentes na área A1 apresentaram maiores chances de infecçãopormembrosdafamília Anaplasmataceae.

As alterações hematológicas encontradas nos animais do GI, GII, GIII e GIV estão apresentadas na Tabela 4. No GI animais trombocitopênicos, com monócitos ativados e anêmicos, apresentaram diferença significativa em relação aos animais sem alterações hematológicas, sendo estas alterações relevantes para a suspeita de hemoparasitoses. No GII, os animais apresentaram leucopenia, trombocitopenia, monócitos ativados e anemia. No GIII, as alterações mais importantes que apresentaram diferença significativa para o diagnóstico de agentes da família Babesiidae foram, linfocitose e anemia. Entretanto no GIV, as alterações mais expressivas para o diagnóstico de agentes da família Anaplasmataceae foram, leucopenia, trombocitopenia, monócitos ativados e anemia.

Em todos os grupos GI, GII, GIII e GIV o sexo e a idade não foram considerados determinantes para à infecção por hemoparasitos. Entretanto, quando o sexo foi avaliado dentro da categoria da variável raça, somente as fêmeas de Pastor Alemão (27,80%) obtiveram valor expressivo para justificar maior prevalência de parasitismo na família Anaplasmataceae.

Tabela 3. Análise bivariada das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança (IC 95%) para hemoparasitos em cães segundo variáveis epidemiológicas em Unidades Privadas de Saúde Animal na zona oeste do Rio de Janeiro (2014 – 2019).

VARIÁVEIS EXPLICATIVAS	N	GI	GII	GIII	GIV
		RP[IC95%]	RP[IC95%]	RP[IC95%]	RP[IC95%]
SEXO					
Macho (ref.) *	812	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
Fêmea	688	1,0[0,8; 1,3]	0,9[0,7; 1,3]	1,1[0,6;2,0]	0,9[0,6; 1,3]
IDADE					
1-8anos (ref.)	554	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
<1 ano	382	1,2[0,7; 2,0]	0,7[0,4; 1,6]	1,0[0,5; 2,0]	0,8[0,5; 1,3]
>8 anos	454	1,3[0,9; 1,8]	0,9[0,6; 1,4]	0,8[0,4; 1,6]	0,8[0,5;1,2]
SI	110	1,3[1,0; 1,8]	1,1[0,8; 1,7]	0,8[0,2; 2,6]	0,6[0,2; 1,4]
PORTE					
Pequeno (ref.)	521	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
Médio	656	1,3[0,9; 1,5]	1,6[1,1; 2,3]	2,2[1,1; 4,7]	1,3[0,8; 2,2]
Grande	124	1,2[0,8;1,9]	2,4[1,4; 4,1]	1,9[0,6; 6,0]	2,6[1,3; 4,8]
RAÇASMISTAS					
SRD (ref.)	551	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
CRD	949	0,9[0,7; 1,2]	0,9[0,7; 1,3]	0,7[0,4; 1,2]	1,1[0,7; 1,7]
RAÇASPURAS					
PittBull (ref.)	32	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
Rottiweiler	46	0,9[0,4; 2,4]	6,3[0,8;47,0]	6,3[0,0;13,6]	4,2[0,5;33,0]
PastorAlemão	40	0,9[0,3; 2,5]	4,0[0,5;32,5]	1,0[0,0; 0,0]	4,0[0,5;32,0]
Labrador	38	1,1[0,4; 2,9]	3,4[0,4;28,6]	2,5[0,0; 7,7]	7,9[0,7;16,5]
CockerSpaniel	73	0,8[0,3; 2,0]	2,6[0,3;21,0]	4,0[0,0;10,2]	1,3[0,1;12,2]
Poodle	334	0,8[0,4; 1,7]	2,2[0,3;15,8]	1,2[0,0; 2,3]	1,8[0,2;13,2]
Yorkshire	44	1,0[0,4; 2,5]	2,2[0,2;20,0]	4,4[0,0;10,7]	0,7[0,1;11,2]
Pinscher	106	0,4[0,2; 1,2]	1,8[0,2;14,5]	2,7[0,0;5,9]	0,9[0,1; 8,4]
Daschund	37	1,4[0,6; 3,5]	0,0[0,0; 0,0]	1,0[0,0; 0,0]	0,0[0,0; 0,0]
CARRAPATO					
Ausente (ref.)	1236	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
Presente	264	2,1[1,6; 2,6]	1,6[1,2; 2,3]	2,6[1,5; 4,7]	1,3[0,8; 2,0]
AREA					
A2(ref.)	285	1,0[1,0;1,0]	1,0 [1,0;1]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0;1,0]
A1	1036	1,7[1,2; 2,4]	2,3[1,4; 3,9]	1,5[0,7; 3,3]	3,0[1,5; 6,2]
A3	179	0,9[0,5; 1,6]	0,7[0,3; 1,8]	0,8[0,2; 2,6]	0,7[0,2; 2,6]

S.I.= Sem informação de idade; S.R.D.= Sem Raça Definida; C.R.D. = Com Raça Definida = União de todas as raças puras; A1, A2 e A3 =áreas de residência dos animais incluídos nas UPSA. **(ref.)** = quer dizer a variável de referência pois apresenta menor prevalência de ocorrência da variável desfecho, então em uma análise de regressão logística ela foi escolhida como referencia para comparação entre pares e verificar qual variável é mais prevalente em relação a variavel de ref. para explicar o desfecho em estudo.

Tabela 4. Análise univariada da prevalência (P) e intervalo de confiança (IC95%) de hemoparasitos em cães e sua associação com variáveis laboratoriais em Unidades Privadas de Saúde Animal da zona oeste do Rio de Janeiro (2014 – 2019).

VARIÁVEIS LABORATORIAIS	N	GI	GII	GIII	GIV
		P(%)[IC95%]	P(%)[IC95%]	P(%)[IC95%]	P(%)[IC95%]
LEUCOCITOSE					
Ausência	1476	15,9[14;17,8]	9,5[8,0;11]	3,0[2,2; 3,9]	6,5[5,2; 7,8]
Presença	24	25,0[7,7;42,3]	20,8[4,6;37,0]	8,3[2,7;19,4]	12,5[0,7;25,7]
LEUCOPENIA					
Ausência	1398	15,4[13,5;17,3]	8,6[7,2;10,1]	2,9[2,0; 3,7]	5,8[4,6; 7,0]
Presença	102	24,5[16,1;32,8]	24,5[16,1;32,8]*	6,9[1,9;11,8]	17,6[10,2;25,0]****
LINFOCITOSE					
Ausência	1494	16,1[14,2;17,9]	9,7[8,2;11,2]	3,1[2,2; 3,9]	6,6[5,4; 7,9]
Presença	6	16,7[1,3;46,5]	16,7[1,3;46,5]	16,7[14,8;48,1]*	0,0[0,0;0,0]*
LINFOPENIA					
Ausência	1443	15,7[13,8;17,6]	9,3[7,8;10,8]	3,0[2,1; 3,9]	6,4[5,1; 7,6]
Presença	57	24,6[13,4;35,7]	19,3[9,0;29,5]	7,0[0,4;13,6]	12,3[3,8;20,8]
EOSINOFILIA					
Ausência	1484	16,0[14,2;17,9]	9,7[8,2;11,2]	3,2[2,3; 4,1]	6,5[5,3; 7,8]
Presença	16	18,7[0,3;37,9]	12,5[3,7;28,7]	0,0[0,0;0,0]*	12,5[3,7;28,7]
EOSINOPENIA					
Ausência	1479	15,9[14,1;17,8]	9,6[8,1;11,1]	3,1[2,2; 4,0]	6,5[5,2; 7,7]
Presença	21	23,8[5,6;42,0]	19,0[2,2;35,8]	4,8[3,4;13,9]	14,3[0,6;29,2]
NEUTROFILIA					
Ausência	1465	16,1[14,2;18,0]	9,8[8,2;11,3]	3,1[2,2; 4,0]	6,6[5,3; 7,9]
Presença	35	14,3[2,7;25,9]	8,6[0,7;17,8]	2,9[0,2; 8,4]	5,7[0,2;13,4]
NEUTROPENIA					
Ausência	1488	16,1[14,2;17,9]	9,7[8,2;11,2]	3,2[2,3; 4,0]	6,5[5,3,7,8]
Presença	12	16,7[4,4;37,8]	16,7[4,4;37,8]	0,0[0,0;0,0]*	16,7[0,4;37,7]
TROMBOCITOPENIA					
Ausência	1233	13,9[11,9;15,8]	5,1[3,9; 6,3]	2,7[1,8; 3,6]	2,4[1,6; 3,3]
Presença	267	26,2[20,9;31,5]*	31,1[25,5;36,6]*	5,2[2,6; 7,9]	25,8[20,6;31,1]*
MONOCITOSE					
Ausência	1477	15,9[14,0;17,8]	9,7[8,2;11,2]	3,2[2,3; 4,1]	6,5[5,2,7,7]
Presença	23	26,1[8,1;44,0]	13,0[0,7;26,8]	0,0[0,0;0,0]*	13,0[0,7;26,8]
MONOCITOPENIA					
Ausência	1493	16,1[14,2;17,9]	9,6[8,1;11,1]	3,1[2,2; 3,9]	6,6[5,3; 7,8]
Presença	7	14,3[1,6;40,2]	28,6[4,9;62,0]	14,3[0,7;40,2]	14,3[0,7;40,2]
MONOCITOSATIVADOS					
Ausência	1361	14,5[12,6;16,3]	7,3[5,9; 8,6]	3,1[2,2; 4,0]	4,2[3,1; 5,2]
Presença	139	31,6[23,9;39,4]*	33,8[25,9;41,7]*	3,6[0,5; 6,7]	30,2[22,6;37,8]*
ANEMIA					
Ht>37%	1317	14,1[12,2;16,0]	7,9[6,4; 9,3]	2,6[1,7; 3,4]	5,3[4,1; 6,5]
Ht<37%	183	30,0[23,4,36,7]*	22,9[16,9;29,0]*	7,1[3,4; 10,8]	15,8[10,5;21,1]****

(*) *p-valor* < (0,05), Ht > 37 % e Ht < 37% = Hematócrito maior e menor que 37%, respectivamente.

A Tabela 5 apresenta a razão entre as prevalências de cada variável laboratorial diante das variáveis desfecho GI, GII, GIII e GIV. Em todos os grupos as alterações laboratoriais que apresentaram associação positiva para ocorrência dos desfechos, foram: leucopenia, trombocitopenia e anemia. Entretanto algumas alterações, apresentaram mesma associação somente para alguns grupos: linfopenia GII e monócitos ativados G1, GII e GIV.

No modelo multivaria do final encontrado na Tabela 6, após análise de regressão logística, a variável presença de carrapato foi associada com o diagnóstico positivo para agentes da família Babesiidae, visto que animais com a presença deste ácaro apresentaram 2,7 vezes maior risco de infecção por agentes da família Babesiidae. Outra variável relacionada com este protozoário foi aanemia. Os animais com esta alteração hematológica apresentaram 1,3 vezes maior chance de estar infectado por este agente. Da mesma forma, cães de grande porte apresentaram 2,9 vezes maior risco de infecção por agente da família Anaplasmataceae. Além disso, a variável monócitos ativados também apresentou associação com esta família, por apresentar 2,3 vezes maior chance de estar infectado por este agente os animais que apresentaram esta alteração laboratorial. Entretanto a variável com maior influência no diagnóstico positivo para agentes da família Anaplasmataceae, foi a trombocitopenia. Os cães trombocitopênicos apresentaram 8,2 vezes maior chance de estar em infectados por estea gente infeccioso. A prevalência de hemoparasitos no mês de junho (12% [IC 95%: 5,6; 18,4%]) e novembro (14% [IC95%: 6,3; 21,8%]) apresentaram as maiores prevalências em relação aoMês de abril (1,2% [IC95%: 0; 3,64%]).

Tabela 5. Análise bivariada das razões de prevalência (RP) e intervalos de confiança (IC 95%) para hemoparasitos em cães segundo variáveis laboratoriais em Unidades Privadas de Saúde Animal na zona oeste do Rio de Janeiro (2014 – 2019).

VARIÁVEIS LABORATORIAIS	N	GI	GII	GIII	GIV
		RP[IC95%]	RP[IC95%]	RP[IC95%]	RP[IC95%]
LEUCOCITOSE					
Ausência (ref.)	1476	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	24	1,5[0,8; 3,2]	2,2[1,0; 4,8]	2.7[0,7;10,6]	1,9[0,6; 5,6]
LEUCOPENIA					
Ausência (ref.)	1398	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	102	1,6[1,1; 2,3]	2,8[1,9; 4,1]	2,4[1,1; 5,2]	3,0[1,9; 4,9]
LINFOCITOSE					
Ausência (ref.)	1494	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	6	1,0[0,2; 6,2]	1,7[0,3;10,3]	5,4[0,9;33,1]	0,0[0,0; 0,0]
LINFOPENIA					
Ausência (ref.)	1443	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	57	1,6[1,0; 2,5]	2,1[1,2; 3,6]	2,3[0,9; 6,3]	1,9[0,9; 4,0]
EOSINOFILIA					
Ausência (ref.)	1484	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	16	1,2[0,4; 3,3]	1,3[0,3; 4,7]	1,9[0,5; 7,0]	0,0[0,0; 0,0]
EOSINOPENIA					
Ausência (ref.)	1479	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	21	1,5[0,7; 3,2]	2[0,8;4,9]	1,5[0,2;10,6]	2,2[0,7; 6,4]
NEUTROFILIA					
Ausência (ref.)	1465	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	35	0,9[0,4;2]	0,9[0,3; 2,6]	0,9[0,1; 6,4]	0,9[0,2; 3,4]
NEUTROPENIA					
Ausência (ref.)	1488	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	12	1[0,3;3,7]	1,7[0,5; 6,2]	0[0;0]	2,6[0,7; 9,2]
TROMBOCITOPENIA					
Ausência (ref.)	1233	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	267	1,9[1,5; 2,4]	6,1[4,5; 8,2]	2,0[1,1; 3,6]	10,6[7,1; 16]
MONOCITOSE					
Ausência (ref.)	1477	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	23	1,6[0,8; 3,3]	1,3[0,5; 3,9]	0[0;0]	2[0,7;5,9]

MONOCITOPENIA					
Ausência (ref.)	1493	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	7	0,9[0,1; 5,5]	1,3[0,5; 3,9]	4,6[0,7;29,1]	2,2[0,3;13,5]
MONOCITOSATIVADOS					
Ausência (ref.)	1361	1,0[1,0;1,0]	1, 0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	139	2,2[1,6; 2,9]	4,6[3,4; 6,3]	1,2[0,5; 2,9]	7,2[5,0;10,3]
ANEMIA					
Ht > 37% (ref.)	1317	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Ht < 37%	183	1,3[1,2; 1,4]	1,4[1,2; 1,6]	1,3[1,1; 1,7]	1,5[1,2; 1,7]

Ht > 37% e Ht < 37% = Hematócrito > e < que 37 %, respectivamente segundo KANECO et al. (1997).

Tabela 6. Análise multivariada das razões de prevalência (RP) com intervalos de confiança (IC95%)para infecção por Babesiidae e Anaplasmataceae em cães associada a variáveis epidemiológicas e laboratoriais na zonaoestedoRiodeJaneiro (2014 – 2019).

VARIÁVEIS EXPLICATIVAS	**N**	**GIII**		**GIV**	
		ModeloCheio RP[IC95%]	**ModeloFinal RP[IC95%]**	**ModeloCheio RP[IC95%]**	**ModeloFinal RP[IC95%]**
PORTE					
Pequeno (ref.)	521	1,0[1,0; 1,0]	-	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Médio	656	2,0[0,9; 4,2]	-	1,3[0,8; 2,0]	1,3[0,8; 2,1]
Grande	124	1,5[0,5; 5,0]	-	2,5[1,5; 4,0]	**2,9**[1,7; 4,7]*
TROMBOCITOPENIA					
Ausência (ref.)	1233	1,0[1,0; 1,0]	-	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	267	1,1[0,4; 2,5]	-	9,4[5,1;17,3]	**8,2**[4,8;13,9]*
ÁREA					
A2 (ref.)	288	-	-	1,0[1,0;1,0]	-
A1	1030	-	-	0,7[0,3; 1,6]	-
A3	182	-	-	0,3[0,1; 1,3]	-
MONÓCITOS ATIVADOS					
Ausência (ref.)	1361	-	-	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]
Presença	139	-	-	2,2[1,5; 3,4]	**2,3**[1,5; 3,6]*
CARRAPATO					
Ausência (ref.)	1236	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0;1,0]	1,0[1,0; 1,0]	
Presença	264	3,0[1,6; 5,7]	**2,7**[1,5; 4,8]*	1,5[1,0; 2,2]	-
ANEMIA					
Ht>37% (ref.)	1317	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	1,0[1,0; 1,0]	-
Ht<37%	183	1,2[0,9; 1,7]	**1,3**[1,1; 1,7]*	1,0[0,8; 1,1]	-

Ht > 37 % e Ht < 37 % = Hematócrito > e < que 37 %, respectivamente segundo KANECO et al. 1997).

4 DISCUSSÃO

Ao analisarmos as prevalências de animais suspeitos de infecção por hemoparasitos devemos considerar alguns aspectos importantes. Os cães estudados em sua maioria quando se encontram suspeitos de infecção por hemoparasitos, são devido à presença de carrapatos que foram encontrados pelo médico veterinário no momento da consulta ou por relato do tutor que retirou manualmente, associado ou não a sinais clinicos sugestivos, sendo estes fatores os mais comuns na rotina das UPSAs (SILVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2016).

A prevalência de cães suspeitos 241 (16,1%) é similar aos estudos realizados por Ferreira et al. (2009) (15,7%), Souza et al. (2010) (16,4%) Silva et al., (2012a) (14%), Silva et al. (2012b) (17,7%). Esses estudos relatam a prevalência de carrapato em cães de ambiente domiciliar e peridomiciliar assistidos em instituições públicas. A similaridade do estudo com essas prevalências está relacionada a suspeita de hemoparasitoses mediante a presença do carrapato ou quando proprietário não consegue controlar a infestação, ou quando o animal manifesta a doença, ou seja, só há preocupação do proprietário de recorrer à consulta veterinária em casos em que o animal já utilizou suas reservas energéticas e não consegue mais combater a doença sozinho. Inquéritos epidemiológicos são necessários já que a maioria dos responsáveis só levam os animais para uma avaliação clínica, quando o animal está doente ou muito debilitado, sendo necessário comprovação, visto que essa afirmação já foi relatada na literatura (SILVA et al., 2016).

A prevalência de cães positivos 9,7% [IC95% :8,2; 11,2%] está de acordo com estudos realizados por Ramos et al. (2009), Silva et al. (2014) e Bernardino et al. (2016) que encontraram prevalências dentro deste intervalo. Esses valores podem estar relacionados com o método utilizado, o exame direto de esfregaço sanguíneo, que além de baixa sensibilidade devido à baixa parasitemia, o resultado negativo sugere fase subclínica ou crônica da doença (BASSI et al., 2011). Além disso pode ocorrer falhas no diagnóstico por artefatos de técnicas relacionadas as inclusões basofílicas que confundem o observador (ALMOSNY, 1998; DAGNONE, 2006; CORREA et al., 2011).

Em um estudo epidemiológico de carrapatos em cães, Silva (2016b) relata um aumento na prevalência de cães com carrapatos (24,8%) quando o diagnóstico de hemoparasitos é acrescentado. Este achado revela que a prevalência de carrapatos apresentou valores subestimados e que o diagnóstico de hemoparasitoses como dados complementares, auxilia no diagnóstico do parasitismo, visto que para o animal manifestar sinais sugestivos de hemoparasitoses a picada do carrapato é de alta relevância, não apenas sua presença

(RODRIGUES- VIVAS et al., 2005; COSTA-JÚNIOR, 2007; SILVA, 2016a; SILVA, 2016b; PAULINOet al., 2018).

A presença de carrapato associado com o risco de infecção por hemoparasitos, já é consenso entre os estudos (RODRIGUES-VIVAS et al., 2005; COSTA-JÚNIOR, 2007; SANTOS et al., 2013, COSTA-JÚNIOR et al.,2013; SILVA et al.,2016; PAULINO et al.,2018). Dos cães suspeitos, foi observado que 28% havia registro no prontuário para a presença de carrapato. Em contraposição, cães com diagnóstico positivo, apresentaram (14.4%).

Na avaliação de risco quanto a presença de carrapato, o Grupo III foi o único que apresentou 2.7 vezes mais chance de infecção por hemoparasitos. A presença de carrapato no momento do diagnótico de piroplasmideos da familia Babesiidae está relacionada aos adultos que estão na ultima fase de desenvolvimento, sendo responsáveis pela transmissão de *Babesia* spp pela via transestadial e transovariana sendo as maiores taxas de infecção dos carrapatos adultos para os cães (ONYICHE et al., 2021)

Resultado similar foi encontrado por (SILVA, 2016a) em que a presença de carrapato foi associada ao diagnóstico de *A. platys* através da qPCR. Estes autores encontraram 2,6 a 5,0 vezes maior risco de infecção por este hemoparasito em cães com moderada a alta infestação de carrapatos, respectivamente. Santos et al. (2013) relatam pela primeira vez no Brasil o diagnóstico de *A. phagocitophilum* em cães associado com a presença de carrapatos com uma prevalência de 3.96 %, após o diagnóstico utilizando exame de biologia molecular.

Estudos epidemiológicos (COSTA-JÚNIOR, 2007; JOJIMA et al., 2008; SILVA, 2016) têm demonstrado que o sexo do hospedeiro é uma variável importante. No presente estudo, a prevalência do sexo não influenciou no diagnóstico dos animais suspeitos para hemoparasitos. Entretanto, quando analisados dentro das raças, as fêmeas de Pastor Alemão foram mais predispostas (Tabela 2). Silva et al. (2012), Costa-Júnior et al. (2013), Cardoso et al. (2015) e Ribeiro et al. (2017) relataram não haver associação entre a positividade por hemoparasitos e a variável sexo. O mesmo ocorreu no estudo de Harrus et al. (1997) com ausência de predisposição sexual. Em outro estudo de dinâmica sazonal de *R. sanguienus* (s.l.), Silveira et al. (2009) encontraram prevalência de carrapatos maior em cães machos (58,3%) do que fêmeas (41,7%).

Um estudo de caracterização molecular de espécies de *Babesia* spp. em Londrina, PR, Jojima et al. (2008) verificaram predisposição sexual para espécies de *Babesia* sp. Na PCR para *Babesia* spp. 22,0 % dos cães positivos foram machos e 15,2 % fêmeas. Na clivagem com enzima de restrição para diferenciação das espécies, obteve-se o perfil para *B. vogeli* 34,3 % em

machos e 28,6% em fêmeas. O mesmo ocorreu para a *B. gibsoni*, 24,8 % foram machos e 12,4 % foram fêmeas. Esses resultados podem ser explicados, já que os cães machos possuem hábitos de cães errantes, ou seja, de sair mais à rua e consequentemente se infestar mais por carrapatos.

Um estudo de levantamento epidemiológico de carrapatos em cães, realizado no Rio de Janeiro, Brasil, encontrou predisposição sexual dentro da raça Cocker Spaniel Inglês, onde a prevalência de carrapatos nos machos (52.5 %) em relação às fêmeas (12.1 %) foi maior (SILVA, 2016b). Os dados são concordantes com Sampaio (2004b) ao afirmar que as fêmeas dos hospedeiros vertebrados possuem uma resposta imunológica mais pronta e eficiente que os machos.

A idade dos cães não foi associada com a suspeita nem com o diagnóstico positivo para hemoparasitos. Assim como Harrus et al. (1997) e Ribeiro et al. (2017) relatam não haver associação entre o diagnóstico positivo pela PCR e a variável idade. Entretanto, Baneth et al. (1996) e Rodrigues-Vivas et al. (2005) encontraram maior prevalência entre cães adultos e idosos utilizando como metodologia o ELISA. Silva (2016a) também encontraram associação da positividade utilizando a qPCR para o diagnóstico de *A.platys* entre cães com idade inferior a seis meses que apresentaram 4,5 vezes mais chance de estarem infectados por *A. platys*. Entretanto, Silva et al. (2012) e Costa-Júnior et al. (2013) não encontraram esta associação. Segundo Bulla et al. (2004) as diferenças encontradas na distribuição do parasitismo por faixa etária se devem, provavelmente, pela grande proporção de animais jovens atendidos na cidade de Botucatu. A associação entre positividade e idade dos cães para os hemoparasitos, poderia estar relacionada como estado imunológico dos animais ou a exposição dos mesmos a carrapatos, vetores desses patógenos (RODRIGUES-VIVAS et al., 2005).

No estudo a metodologia diagnóstica, registrada nos prontuários, foi o exame direto de esfregaço sanguíneo em lâminas coradas pelo Panótico®, não sendo possível diferenciar os agentes da família Anaplasmataceae, possivelmente este seja um dos motivos da ausência da associação do diagnóstico positivo com a idade dos animais. Em seu estudo com animais jovens, Tommasi et al. (2014) encontraram inclusões parasitárias em células precursoras de trombócitos na medula óssea, sugerindo a predileção de *A.platys* por infectar cães jovens. São necessários mais estudos para elucidar o envolvimento da variável idade relacionada à predisposição com diferentes hemoparasitos que acometem os cães.

Dos animais suspeitos de infecção por hemoparasitos (GI), nas raças puras (CRD), não houve predominância na suspeita entre elas. Entretanto, a raça Daschund foi a de maior prevalência (30,4%), devido aos achados clínicos registrados nos prontuários e principalmente

pelapresençade carrapato. Sendo que, os animais com diagnóstico positivo (GII) entre as raças CRD somente a raça Daschund diferiu dos outros animais devido à ausência de diagnóstico positivo. O hábito desta raça de pequeno porte, permanecer maior parte do tempo dentro dos domicílios, propicia que o seu tutor realize com maior frequência inspeções visuais e manuais e o hábito de catação de carrapatos, e quando encontrados, rapidamente conduzem o animal para o Veterinário, evitando dessa forma, que o mesmo adquira patógenos transmitidos por carrapatos (SILVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2016b).

Os animais suspeitos da raça Daschund, que foram selecionados (n= 37), não fizeram exame de sangue para auxiliar no diagnóstico definitivo, razão pela qual não obtiveram diagnóstico positivo. Uma das justificativas desta raça no GII não apresentar prevalência para hemoparasitos, e apresentar maior suspeita de parasitismo do que o diagnóstico.Outra explicação do diagnóstico negativo para esta raça, além da baixa sensibilidade deste método, seria a predisposição racial, visto que esta raça apresenta prevalência relevante de carrapato (18,9%) sem apresentar associação positiva para o seu parasitisnmo (SILVA, 2016b). As raças Poodle (82.6%) Rottweiler (75%) e SRD (60.7%) foram aquelas mais prevalentes entre as principais raças comumente atendidas na clínica de pequenos animais com diagnóstico positivo para agentes da família Anapalasmataceae.

Animais com presença de carrapatos foram mais propensos a estarem infectados por agentes da família Babesiidae, apresentando 2,7 vezes maior risco de infecção por agentes desta família (Tabela 6). Trapp et al. (2006) em um estudo de cães atendidos no Hospital da Universidade Estadual de Londrina, Brasil; também encontraram cães infestados por carrapatos mais propensos e sororeatores para *B.vogeli*. Segundo Dumler et al. (2005), novos estudos de interação entre hospedeiros e hemoparasitos se fazem necessários para a compreensão da interação entre os agentes, células hospedeiras e avaliação imunológica do hospedeiro, visto que a presença e ausência de carrapato tem influenciado no diagnóstico de hemoparasitoses (DUMLER et al., 2005; RODRIGUES-VIVAS et al., 2005; TRAPP et al., 2006).

Já é consenso entre alguns autores que os hábitos e ambientes em que vivem os cães exercem influência na frequência de agentes patogênicos transmitidos por artrópodes. Os cães com hábitos de perambular entre ambientes domiciliar, peridomiciliar e silvestre possibilitam a circulação de patógenos distintos entre animais de ambiente urbano e silvestre, diferente dos animais que vivem restritos ao ambiente (SZABO et al. 2013; LUZ et al. 2014; CAMPOS et al., 2020).

Alguns entre outros, como *H. canis* têm sido relacionado com ambiente rural, e tem como vetores, duas espécies de carrapato, *A. ovale* e *R. sanguineus senso latu (s.l.)* (O'DWYER et

al. 2001; O'DWYER et al. 2009; GIANELLI et al. 2013). Já ambientes de clima frio e grande altitude o artrópode vetor para *Rangelia vitalli* **(**RIBEIRO et al. 2017) restrito ao ambiente onde vive, podemos enumerar diversos vetores em potencial como: *R. sanguineus senso latu (s.l.)* (espécies tropicais e temperadas), *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. sculptum*. Em 2018 foi demonstrado que o carrapato *A. aureolatum* é capaz de transmitir via transestadial e transovariana a *Rangellia vitalli,* sendo considerado seu vetor natural (SOARES et al., 2018).

Apesar das raças com maior prevalência no GIV terem sido as raças Poodle (82,6%), Rottweiler (75%) e o SRD (60.7%), não houve diferença significativa entre elas (Tabela 1). Mesmo quando estas raças foram avaliadas através davariável porte, não houve diferença entre as categorias pequeno, médio e grande porte. Após análise bivariada e multivariada, os animais de grande porte apresentaram 2,6 vezes maior chance de se infectar por agentes da família Anaplasmataceae. Resultado semelhante foi encontrado por Araújo et al. (2015), que após análise multivariada encontrou cães de médio porte com 2,98 vezes maior risco de infecção por *B. vogeli*.

O ambiente onde residiam os cães, representado pelas áreas de abrangência do estudo A1, A2 e A3, tiveram suas prevalências influenciadas pelo número de cães com diagnóstico positivo. Na Área 1, foi verificado as maiores prevalências para o parasitismo por hemoparasitos mesmo quando considerados todos os grupos GI, GII, GIII e GIV (Tabela 1 e 3).

Em contraposição a Área 2 recebeu em sua maioria animais de Inhoaíba, um bairro com 64.649 habitantes e 21.893 domicílios (IBGE, 2010). Se considerarmos só o bairro Bangu, são 243.125 habitantes e 83.068 domicílios. Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) (IBGE, 2010), a relação cão / domicílio no Brasil foi estimada em 1,8 animal / domicílio e em relação à população, um cão para cada 7 habitantes. Nesse contexto e considerando o número de domicílios, o bairro Bangu e Inhoaíba teriam uma população canina estimada em 46.149 e 12.163, respectivamente, ou seja, Bangu tem uma população canina aproximadamente 4 vezes maior que Inhoaíba.

Apesar da sua importância no contexto epidemiológico, sendo verificado prevalências altas de parasitismo com destaque da Área 1 em relação as outras áreas, não foi verificado associação desta variável com os desfechos em estudo. Este resultado foi discordante com Araújo et al. (2015) que em seu trabalho relata a área de floresta ser um fator de risco 2,22vezes maior para cães se infectarem com *B. vogeli*.

Á área de estudo em questão foi ambiente urbano, local onde o principal vetor dos patógenos, *R. sanguienus senso latu* (s.l.) encontra-se em perfeita adaptação com prevalência

chegando a 100% (GUIMARÃES et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; ALMEDA et al., 2013), oferecendo desta forma grande influência no parasitismo. Uma das justificativas para explicar a exclusão desta variável da análise multivariada, seria a influência de outras variaáveis expicativas de exposição serem maiores para justificar o parasitismo nesses animais, além da possibilidade de variaveis intrinsecas aos animais serem responsáveis para responder ao parasitismo mais que as variáveis extrínsecas.

As alterações laboratoriais relacionadas com o parasitismo foram: leucopenia, linfocitose, trombocitopenia, monócitos ativados e anemia apresentaram fator de risco para pelo menos um gruo analisado. Estes dados são corroborados por Almosny (2002), exceto para linfocitose e monócitos ativados.

A leucopenia, uma alteração relacionada com processo infeccioso e imunitário, é evidenciada somente a partir da quarta semana pós infecção, sendo uma alteração preocupante por estar relacionada com a supressão medular (OLIVEIRA et al. 2000; AROCH; HARRUS, 2001; HARVEY,2001; ALMOSNY2002; CASTROet al. 2004) sendo em alguns casos, como hemoparasitoses, se faz necessário uso de estimulantes de colônia de granulócitos (rhG-CSF) (AROCH; HARRUS, 2001; LUCIDI; TAKAHIRA, 2007). Somente os animais do GII e GIV (*p-valor* < 0,05) na primeira análise e animais do GII, GIII e GIV na segunda análise laboratorial apresentaram diferença por conter animais positivos para agentes de ambas as famílias e possivelmente por estarem na fase aguda da doença. Vários autores descrevem diferentes prevalências de animais com leucopenia: (32,7 %) OLIVEIRA et al. (2000); (30,0 %) MOREIRA et al.(2003); (10,05 %) ALBERNAZ et al. (2007); (35,2 %) JOJIMA et al. (2008); (50,8 %) BASSI et al. (2011), entretanto esses dados são importantes na avaliação da infecção por hemoparasitoses, principalmente pela patologia grave em afetar células do sistema monocítico fagocitário (S.M.F.) porém inespecíficos quando avaliados isoladamente, sendo necessário exames complementares para acompanhamento. Logo após análise de regressão, esta variável foi excluída do modelo por não apresentar associação com os desfechos em estudo.

A linfocitose é uma alteração laboratorial envolvida com a produção de anticorpos. Como alteração envolvida em casos de hemoparasitoses, segundo alguns autores não é comum seu relato (OLIVEIRA et al., 2000; MOREIRA et al., 2003; ALBERNAZ et al., 2007). De acordo com Davoust (1993) a linfocitose, acompanhada de linfócitos atípicos ou reativos, foi associada com ehrliquiose, entretanto o único grupo que apresentou esta alteração (*p-valor* < 0,05) foi o GIII, sendo a leucopenia predominante nos animais positivos, corroborando com os achados de Almosny (2002). Uma das justificativas para encontrar esta

alteração, seria a relação da linfocitose com a infecção causada pela hemólise intravascular disseminada comum em agentes da família Babesiidae associada a anemia com Ht < 37% e prevalência (7.1% [IC 95%: 3.4; 10.8%]) que neste grupo foi a menor encontrada em relação aos demais. Entretanto na análise multivariada final somente a anemia se mostrou associação positiva importante para o GIII.

A trombocitopenia foi a principal variável laboratorial explicativa, devido sua participação comum e com grande frequência na maioria das hemoparasitoses de animais domésticos (ALBERNAZ et al.,2007; JOJIMA et al.,2008; BASSI et al.,2011; SILVEIRA et al.,2015). Sua prevalência nos grupos estudados variou de 25,8 a 31,1%. Na análise multivariada final revelou a trombocitopenia está altamente associada a positividade para agentes da família Anaplasmataceae (RP=8,2[IC95% :4,8;13,9]).Um estudo no México, Rodrigues-Vivas et al. (2005) encontraram animais com trombocitopenia com 18,9 vezes mais chances de estarem infectados por *E. canis* (OR = 18,9 [IC 95%: 4,5; 80%]).Esta variação nos fatores de risco encontrada pode ser explicada devido a condição imunológica do animal, a distribuição geográfica do vetor e sua capacidade vetorial, a virulência da cepa infectante e o período médio do estudo na população. (RODRIGUES-VIVAS et al., 2005).

Os animais com diagnóstico positivo possivelmente estavam na fase aguda da doença, visto que não foi encontrado nenhum caso grave somente casos brandos e inespecíficos. Estes dados foram confirmados por Waner et al. (1997) e Rodrigues-Vivas et al. (2005). Não há sinal clínico patognomônico da *E.canis*, no entanto Ristic e Holland (1993) descobriram que o sangramento relacionado as plaquetas é um dos achados mais comuns em animais na fase aguda da doença. Rodrigues-Vivas et al. (2005) verificaram que a presença de trombocitopenia, associada a epistaxe é uma resposta positiva a infecção por *E. canis* e quando presente, aumenta a suspeita para infecção por esta bactéria.

Breitschwerdt (1997) relataram que a trombocitopenia é a alteração hematológica mais comun na fase aguda e crônica, sendo adotada por médicos veterinários como base no diagnóstico da erliquiose. Entretanto Bulla et al. (2004) consideram que sinais clínicos e métodos diagnósticos associados a trompocitopenia são necessários para a o diagnóstico definitivo da enfermidade. Yabsley et al. (2008) sugerem que diagnósticos diferenciais devem ser feitos para cães que apresentem trombocitopenia, leucopenia, febre ou letargia.

A presença de monócitos ativados é normalmente atribuída a inflamações crônicas e à presença de hemoparasitas (BULLA et al., 2004). Em todos os grupos estudados, houve uma pequena variação dos casos apresentando alterações morfológicas de monócitos compatíveis com ativação. O número de monócitos aumentado variou entre 13 e 26%, porém o Grupo III

não apresentou diferença significativa em monócitos ativados nem monocitose. Com este resultado Bulla et al. (2004) observaram que a alteração do número de monócitos ou a ativação não são achados muito frequentes na fase aguda da erlichiose, tendo assim pouco valor diagnóstico. Entretanto após análise de regressão logística os monócitos ativados apresentaram 2,3 vezes maior chance dos cães que apresentaram esta alteração estarem infectados com agentes da família Anaplasmataceae (Tabela 6).

A anemia foi a alteração laboratorial com significância clínica e estatística. Os grupos analisados na análise univariada apresentaram uma variação de 7,1 a 30%. Entretanto na após análise multivariada, revelou associação positiva 1,3 (IC 95%: 1.02; 1.7) para agentes da família Babesiidae. A fase aguda pode estar relacionada com aumento de destruição ou diminuição de produção eritrocitária. Segundo Bulla et al. (2004) em seu estudo e Albernaz et al. (2007) os casos de anemia moderada foram os mais frequentes (67,7%), (60,4%) respectivamente, seguidos por anemias intensas (17,8%) (BULLA et al., 2004). Esses achados corroboram a suspeita de anemias multifatoriais, já que, nesses casos, anemias leves e moderadas são esperadas. Mesmo com associação positiva (RP=1.3[IC95%: 1.02; 1.7]) para o parasitismo, a anemia foi considerada importante como parâmetro na avaliação diagnóstica de agentes da família Babesiidae.

A prevalência de hemoparasitos nos meses do ano apresentou uma variação nos seus valores, entretanto o mês de junho (12% [IC 95%: 5,6; 18,4%]) e novembro (14% [IC 95%: 6,3; 21,8%]) apresentaram as maiores prevalências em relação ao mês de abril (1,2% [IC 95%: 0; 3,6]) associadas com animais apresetando sinais compatíveis com hemoparasitoses. Um estudo no Paraná conduzido por Ribeiro et al. (2017) relatam maior número de cães positivos para *A. platys* no inverno. De forma empírica a experiência mostra na rotina de uma clínica veterinária no bairro de Santa Cruz município do Rio de Janeiro, que animais suspeitos de hemoparasitoses aparecem com resultado de Snap 4Dx positivo para *Anaplasma* spp. maior no início do inverno, e no verão essa frequência é reduzida prevalecendo o diagnóstico por *Ehrlichia* spp. Inquéritos soroepidemiológicos são necessários para através de resultados com análises estatísticas e relevantes para explicar a frequência desta bactéria acontecer com maior frequência no inverno.

Esses resultados mostram a importância do exame hematológico como exame de triagem para direcionar o diagnóstico e apoiar como exame complementar ao diagnóstico clínico em regiões onde há carência de recursos financeiros principalmente por parte dos responsáveis legais dos animais. Apesar dos dados de hematologia oferecerem um diagnóstico direto com baixa sensibilidade, a utilização de modelos estatísticos ressalta e enfatiza dados

negligenciados. Logo, os resultados sugerem que a associação de dados laboratoriais e outras variáveis epidemiológicas podem estar envolvidas com enfoque em raças puras susceptíveis, de forma a buscar maior entendimento para a profilaxia e controle destas enfermidades.

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os cães de grande porte, trombocitopênicos e com monócitos ativados apresentam maior chance de infecção por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. e cães anêmicos e com presença de carrapatos apresentam maior chance de infecção por *Babesia* spp.

O hemograma continua sendo o exame de escolha para triagem clínica e laboratorial para traçar um prognóstico para o animal suspeito de hemoparasitose, sugerindo que animais trombocitopênicos e anêmicos podem estar infectados e necessitam de exames complementares para diagnóstico definitivo.

As raças de cães envolvidas no estudo não apresentaram diferença significativa na prevalência de hemoparasitoses, sendo necessário maiores investigações quanto a sua susceptibilidade e fatores de riscos envolvidos, em especial para as raças de grande porte como Pastor Alemão, Labrador e Rottweiler.

A raça Pastor Alemão em especial merece destaque, visto que apresentou maior prevalência entre as fêmeas no parasitismo, por serem mais acometidas que os machos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification, in IEEE **Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974, doi: 10.1109/TAC.1974.1100705.

ALBERNAZ, A.P.; MIRANDA, F.J.B.; MELO, A.O.; MACHADO, J.A.; FAJARDO, H.V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.4, p.799-806, 2007.

ALMEIDA, M.A.O.; BARROS, M.T.G.; SANTOS, E.P.; AYRES, M.C.C.; GUIMARÃES, J.E.; GONDIM, L.F.D. Parasitismo de cães por microfilárias de *Dirofilaria immitis*: Influência da raça, sexo e idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.3, p. 59-64, 2001.

AROCH, I.; HARRUS, S. The use of recombinant human colony stimulating factor and recombinant human erythropoietin in the treatment of severe pancytopenia due to canine monocytic ehrlichiosis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.56, n.2, p.65-69, 2001.

ARAÚJO, A.C.; SILVEIRA, J.A.G.; AZEVEDO, S.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; RIBEIRO, AZEVEDO, S. S.; ANTONELLI, A. C.; RIBEIRO, M. G.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, H. A.; VIEIRA, T. S. W. J.; LABRUNA, M. B. Soroprevalência e fatores de risco associados às hemoparasitoses em cães domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 312-318, 2011.

ALMEIDA, A.B.P.F.; PAULA, D.A.J.; DAHROUG, M.A.A.; FREITAS, A.G.; SILVA, J.N.; DUTRA, D.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R.F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1123-1126, 2012.

ALMEIDA, R.F.C.; GARCIA, M.V.; CUNHA, R.C.; MATIAS, J.; SILVA, E.A.; MATOS, M.F.C.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil, **Experimantal and Applied Acarology,** v. 60, p. 63–72, 2013.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202p. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 1998.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In:.Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. 1ª ed. Rio de Janeiro: **L.F.Livros**, 2002. p.13-56.

ARAÚJO, A.C.; SILVEIRA, J.A.G.; AZEVEDO, S.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; RIBEIRO, M.F.B.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.5, p. 456-461, 2015.

AZEVEDO, S. S.; ANTONELLI, A. C.; RIBEIRO, M. G.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, H. A.; VIEIRA, T. S. W. J.; LABRUNA, M. B. Soroprevalência e fatores de risco associados às

hemoparasitoses em cães domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 312-318, 2011

BANETH, G.; THAMSBORG, S.M.; OTRANTO, D.; GUILLOT, J.; BLAGA, R.; DEPLAZES, P.; SOLANO-GALLEGO, L. Major parasitic zoonoses associated with dogs and cats in Europe. **Journal of Comparative Pathology**, v.155, n.2, p. 54-74, 2016.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**, v. 138, p. 257–259, 1996.

BARROS, A.J.D.; HIRAKATA, V.N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. BMC **Medical Research Methodology**, v. 3, n. 21, 2003

BASSI, P.B.; MOREIRA, T.K.; SILVA, C.C.; BITTAR, E.R.; BITTAR, J.F.F. Aspectos clínicos, epidemiológicos, hematológicos e sorológicos de animais diagnosticados com *Ehrlichia canis* no Hospital Veterinário de Uberaba-MG **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, n.31, p. 678-680, 2011.

BERNARDINO, M.G.S.; MEIRELES, M.V.N.; SILVA, E.G.; XAVIER, F.J.R.; SATAKE, F. Prevalência de Hepatozoonose canina no município de Areia, Paraíba, Brasil**, Biotema**, v. 29, n.1, p. 175-179, 2016.

BEALL, M.J.; ALLEMAN, A.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; COHN, L.A.; COUTO, C.G.; DRYDEN, M.W.; GUPTILL, L.C.; IAZBIK, C.; KANIA, S.A.; LATHAN, P.; LITTLE, S.E.; ROY, A.; SAYLER, K.A.; STILLMAN, B.A.; WELLES, E.G.; WOLFSON, W.; YABSLEY, M.J. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 29, p. 2-11, 2012.

BENIGNO, R. N. M.; SOUZA, N. F.; FIGUEIREDO, M. J. M. F.; OLIVEIRA, C. M.; MACIEL, S. P.; COSTA, J. S.; TORRES, M. M. S.; ALMOSNY, N. R. P. Avaliação das infecções por *Babesia* e *Ehrlichia* em cães e risco de infecção humana por estes bioagentes transmitidos por carrapatos em Campinas, São Paulo. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 4, p. 238-245, 2011.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.3, p. 566-571, 2009.

BREITSCHWERDT, E.B. Riquetsioses. In: ETTINGER SJ, FELDMAN EC (2004) Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 423-427.

BREITSCHWERDT, E.B., The rickettsioses. In: ETTINGER SJ, FELDMAN EC (1997) **Textbook of Veterinary Internal Medicine. Philadelphia**: WB Saunders Company, 376-383.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asia

genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172- 4177, 2005.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; PAPAROTTO, T.; LANGRAFE, L.; PAES, P.R.; LOPES, R.S. Fase aguda da Ehrlichiose monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. **Medvep** R**evista Cientifica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais de Estimação**, v. 2, n. 6, p. 82-85, 2004.

CAMPOS, D. S.; SOUZA, C. A.; LIMA, R. F.; ALMEIDA, P.H.; SILVA, J.C.R. Epidemiologia molecular e fatores ambientais associados a patógenos transmitidos por vetores em cães domésticos atuando como sentinelas em ecótonos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, p. e004-520, 2020.

CARDOSO, L M; OLIVEIRA, D A; SANTOS, R F; MENEZES, A B; COSTA, L A**.** Predisposição de gênero e raça no diagnóstico molecular e citológico de hemoparasitoses na clínica de pequenos animais**. Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 104-111, 2015.

CARLOS, R.S.A.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; ALMOSNY, N.R.P.; ALBUQUERQUE, G.R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.3, p. 210-214, 2011.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.S.; ALESSI, A.C.; COSTA, Marcus Vinícius. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. ***Veterinary Parasitology***, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 33, n. 4, p. 863–884, 2003.

CORREA, M. W.; SILVA, J. M; RAMOS, C. A.; SANTOS, R. F.; SOUZA, M. M. Diagnóstico molecular e citológico de *Anaplasma platys* em populações de pequenos animais domésticos e sua correlação com achados hematológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 320-327, 2011

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

COSTA, M. S. O.; MOURA, J. R. S. Unidades de paisagem e variabilidade térmica espacial na Área de Planejamento 5 (AP5) do município do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 3, n. 1, p. 45-58, 2003.

COSTA-JÚNIOR, L.M. Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais: Utilização de métodos diretos, indiretos e moleculares. 2007. 97p. **Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais**, 2007.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; RIBEIRO, M.F.; REMBECK, K.; RABELO, E.M.; ZAHLER-

RINDER, M.; HIRZ-MANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n.2, p. 257–260, 2009.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; REMBECK, K.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.109, n.1, p. 321-326, 2013.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; MARIA, M.D.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis.**Veterinary Parasitology,** v.128, n.1, p. 149–155, 2005.

DAGNONE, A.S. Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal, SP e de Campo Grande, MS. 2006. 118 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2006.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p. 20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.153, n.4, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Northeastern Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 75-77, 2009

DAVOUST B. Canine ehrlichiosis. **Point Vétérinarie**, v. 25, 1993.

DE TOMMASI, A. S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E.B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; DE CAPRARIIS, D. *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2231-2234, 2014

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.D.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p. 2145–2165, 2001.

DUMLER, J.S.; CHOI, K.S.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BARAT, N.S.; SCORPIO, D.G.; GARYU, J.W.; GRAB, D.J.; BAKKEN, J.S. Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum* **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n. 12, p. 1828-1834, 2005.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E.*

canis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 11, p. 540–543, 1991.

FERREIRA, C. A.; SILVA, M. E.; GOMES, R. A. Prevalência de infestações por ectoparasitas em cães de áreas urbanas assistidos em hospitais veterinários públicos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 112-118, 2009.

FERREIRA, C. G. T.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. R.; LACERDA, A. C.; COSTA, M. T.; SANTOS, L. R. Influência de fatores epidemiológicos e da fase de infecção na prevalência de hemoparasitoses em populações caninas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 142-148, 2007.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W**.** Serologic, hematologic, and systemic effects of *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2407-2415, 1983.

FURUTA, P.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; TEIXEIRA, M.C.A.; ROCHA, A.G.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 41-45, 2009.

GIRARDI, A.F.; LIMA, S.R.; MELO, A.L.T.; SORTE, E.C.B.; ALMEIDA, A.B.P.F.; MENDONÇA, A.J.; AGUIAR, D.M.; SOUSA, V.R.F. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e *Ehrlichia canis* em cães com alterações nervosas atendidos em hospital veterinário universitário **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1913-1922, 2014.

GIANNELLI, A.; RAMOS, R.A.N.; DIPAOLA, G.; MENCKE, N.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; OTRANTO, D. Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.1, p.1-5, 2013.

GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M.R.; SOARES, J.F.; GONÇALVES, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; COSTA, M.M.; LABRUNA, M.B.; BORTOLINI, C.E.; MACHADO, R.Z.; VIEIRA, M.I.B. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 172-178, 2016.

GUEDES, P.E.B.; OLIVEIRA, T.N.A.; CARVALHO, F.S.; CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE, G.R.; MUNHOZ, A.D.; WENCESLAU, A.A.; SILVA, F.L. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 115-121, 2015.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, B.S.; ROCHA, C.M.B.M. Ectofauna parasitária de cães urbanos domiciliados atendidos em clínicas veterinárias particulares na cidade de Lavras, M G. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n.1, p. 172-177, 2011.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360 - 363, 1997.

HARVEY, J.W. Atlas of veterinary hematology – Blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia: Saunders, 2001. 228p

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a

Rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases** v. 137, p. 182–188, 1978.

HOSKINS J.D. (1993) **Pediatria Veterinária.** Manole, São Paulo. 605p.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression. New York: Wiley. 2013.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resultados preliminares do Censo (2010).Disponível:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_ dou/RJ2010.pdf Acessado em: 05/06/2019.

INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitologyn**, v. 115, n.1, p.343–348, 2003.

INOKUMA, H.; FUJII, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J.P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon groESL and the Citrate Synthase Gene (gltA) of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1132–1136, 2002.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 20-27, 2007.

JOJIMA, F.S.; GARCIA, J.L.; VIDOTTO, M.C.; BALARIN, M.R.S.; FABRETTI, A.K.; GASPARINI, M.R.; COELHO, A.L.M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L**.** (ed.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932

KJEMTRUP, A.M.; WAINWRIGHT, K.; MILLER, M.; PENZHORN, B.L.; CARRENO, R.A. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine Babesia, identified in California. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 103-111, 2006.

KRAWCZAK, F.S.; LABRUNA, M.B.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F.; SOARES, J.F.; LOPES, S.T.A. Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 415-417, 2012.

LABARTHE, N.; PEREIRA, M.C.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Erlichia canis* and *Borreli*a *burgdorferi* infections in Brazil. **VeterinaryTherapeutics**, v.4, n.1, p. 67- 75, 2003.

LABRUNA, M. B.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; NETO, J.S.F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, Eastern Amazon, Brazil, **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n.5, p. 774-776, 2000.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001a.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A.; AGUIAR, D.M.; YABSLEY, M.J.; DAVIDSON, W.R.; STROMDAHL, E.Y.; WILLIAMSON, P.C.; STICH, R.W.; LONG, S.W.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

LEAL, P.D.S.; MORAES, M.I.M.R.; BARBOSA, L.L.O.; LOPES, C.W.G. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 1, p. 55-62, 2015.

LEMOS, T.D.; CERQUEIRA, A.M.F.; TOMA, H.K.; SILVA, A.V.; CORRÊA, R.G.B.; PALUDO, G.R.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 137-142, 2012.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics of NorthAmerica: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1121 - 1140, 2010.

LUCENA, A. J. A ilha de calor na Região Metropolitana do Rio de Janeiro: uma abordagem a partir do sensoriamento remoto e de modelagem numérica. 2010. 320 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Instituto Alberto Luiz C. de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2010

LUCIDI, C.A.; TAKAHIRA, R.K. Uso do estimulante de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 915-920, 2007.

LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H. Carrapatos parasitando cães em área insular do estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 4, p. 437-442, 2014.

MEDRONHO, R.A.; BLOCH, V.K.; LUIZ, R.R.; WERNECK, G.L. Epidemiologia. São Paulo: **Atheneu**; 2009.

MENESES, I.D.S.; SOUZA, B.M.P.S.; TEIXEIRA, C.M.M.; GUIMARÃES, J.E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

MORAES, P.H.G.; RUFINO, C.P.; REIS, T.; AGUIAR, D.C.F.; MENESES, A.M.C.; GONÇALVES, E.C. Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 105-108, 2014.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, M.G, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.

MOREIRA, S.M.; MACHADO, R.; PASSOS, L.F. Detection of *Ehrlichiacanis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.

MOTOI, Y.; SATOH, H.; LNCKUMA, H.; KIYUUNA, T.; MURAMATSU, Y.; UENO, H.;

MORITA, C. First Detection of *Ehrlichia platys* in Dogs and Ticks in Okinawa, Japan **Microbiology and Immunology**, v. 45, n. 1, p. 89-91, 2001

MYLONAKIS, M.E.; DAY, M.J.; SIARKOU, V.; VERNAUX, W.; KOUTINAS, A.F. Absence of Myelofibrosis in Dogs with Myelosuppression Induced by *Ehrlichia canis* Infection.**Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 4, p. 328-331, 2010.

NAKAGHI, A.C.H.; ARAÚJO, P.G.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 766-770, 2008.

NEER, T.M. Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: Greene CE, ed. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2nd ed. Philadelphia, PA: **WB Saunders** 139-147, 1998.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M. Cell-mediated and humoral immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis.* **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250–254, 1980.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary**. **Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 143–150, 2001.

O'DWYER, L.H.; LOPES, V.V.A.; RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 23-26, 2009.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C.T.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Anti-*Ehrlichiacanis* antibodies detection by "Dot-ELISA" in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

ONYICHE, T.G E.; RĂILEANU, C.; FISCHER, S.; SILAGHI, C. Global distribution of *Babesia* species in questing ticks: a systematic review and meta-analysis based on published literature. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 230, 2021.

PALMAS, C.; BORTOLETTI, G.; CONCHEDDA, M.; CONTINI, C.; GABRIELE, F.; ECCA, A.R. Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitologia**, v. 43, n. 1, p. 29–35, 2001.

PAULAN, S.C.; LINS, A.G.; TENÓRIO, M.S.; SILVA, D.T.; PENA, H.F.; MACHADO, R.Z.; GENNARI, S.M.; BUZETTI, W.A. Seroprevalence rates of antibodies against Leishmania infantum and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 162–166, 2013.

PAULINO, P.G.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PECKLE, M.; COSTA, R.L.; VITARI, G.V.; VILELA, J.A.R.; ABREU, A.P.M.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brasil **Preventive Veterinary Medicine**, v. 159, n. 1, p. 135-142, 2018.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of New York Academy**

of Sciences, v. 1078, n. 1, p. 110-117, 2006.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; CANÇADO, P.H.D.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 229-362, 2011.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2019. Acesso< https://www.R-project.org/. http://webcanine.com/wp-content/uploads/2007/04/risk.pdf> Acesso em 17jun2019.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES, D.S.; SOUZA, I.I.F.; ONO, T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.O.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Comparação de *nested*-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 58-62, 2009.

REDDY, B. S.; SIVAJOTHI, S.; REDDY, L. S. V.; RAJU, K. G. S. Clinical and laboratory findings of Babesia infection in dogs. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 268-272, 2014.

RIBEIRO, C.M.; MATOS, A.C.; AZZOLINI, T.; BONES, E.R.; WASNIESKI, E.A.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LUCHEIS, S.B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 129 -136, 2017.

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. **Ciência Rural**, v. 27, n.2, p. 285-289, 1997.

RIKHISA, Y. The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases. **American Society for Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.

RISTIC, M.; HOLLAND, C. J. Canine ehrlichiosis. *In*: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, Miodrag (ed.). Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals**. Oxford: Pergamon Press**, 1993. p. 169-186.-

RODRIGUES-VIVAS, R.I.; ALBORNOZ, R.E.; BOLIO, G.M. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology Amsterdam**, v. 127, n. 1, p. 75-79, 2005.

ROTONDANO, T.E.F.; ALMEIDA, H.K.A.; KRAWCZAK, F.D.S.; SANTANA, V.L.; VIDAL, I.F.; LABRUNA, M.B.; MELO, M.A.D. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 52-58, 2015.

ROTONDANO, T.E.F.; KRAWCZAK, F.S.; BARBOSA, W.O.; MORAES-FILHO, J.; BASTOS, F.N.; LABRUNA, M.B.; AZEVEDO, S.S.; MELO, M.A.; ALMEIDA, A.M.P. *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraiba state, northeastern Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 211-215, 2017

SAMPAIO, I.B.M. (2004a) Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2ªed. Belo Horizonte**: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 265 p.

SAMPAIO, I.B.M. Aspectos importantes da experimentação em Parasitologia (geralmente não considerados pelo pesquisador) **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 178-179, 2004b.

SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.R.; ZUCOLOTO, L.B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.; COSTA, R.L.; SANTOS, M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vetores**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.

SILVA, C.B. Detecção de *Anaplasma platys* em cães e em carrapatos: Padronização de qPCR e análise epidemiológica no estado do Rio de Janeiro, Brasil e na região ocidental de Cuba. 2016. 109p. Tese (Doutorado). **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. 2016a.

SILVA, S.R. Levantamento epidemiológico de carrapatos em cães assistidos em duas unidades privadas de serviço de saúde animal na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro 2016. 56p. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. 2016b.

SILVA, S.R.; LOURENÇO, E.C.; TASSINARI, W.S.; FAMADAS, K.M. Estudo descritivo da série histórica de ocorrência de carrapatos em cães assistidos em duas unidades privadas de saúde animal na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, Brasil **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 171-177, 2016.

SILVA, L.G.; MENDES, C. R.; SOUZA, M. V.; ALMEIDA, P. H**.** Fatores de risco associados à presença de ectoparasitas em cães assistidos por instituições públicas de saúde animal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 89-96, 2012a.

SILVA, L. G.; COSTA, B.H.; REIS, J. M.; MATOS, S. R.; PEREIRA, T. F**.** Hemoparasitoses caninas e a relação com a percepção do proprietário sobre o controle de infestações por carrapatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 32, n. 8, p. 710-717, 2012b

SILVA, A.S.; OLIVEIRA, D. A.; COSTA, L. A.; MOREIRA, M. S.; SANTOS, R. F. Ocorrência e identificação parasitológica periférica de hemoparasitos em populações de caninos da zona rural e urbana. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 174-179, 2014.

SILVEIRA, J.A.G.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Population Dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae), in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3, p. 270 – 275, 2009.

SILVEIRA, J.A.G.; VALENTE, P.C.L.G.; PAES, P.R.O.; VASCONCELOS, A.V.; SILVESTRE, B.T.; RIBEIRO, M.F.B. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian Dog. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 242-245, 2015.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vetor of *Ehrlichia platys*, **American Journal Veterinary Research**, v.52, n. 9, p. 1537-1541, 1991.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.R.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **American Journal Veterinary Research,** v. 37, n. 2, p. 119-26, 1976.

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.S.F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de For a, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006.

SOARES, J.F.; COSTA, F.B.; GIROTTO-SOARES, A.; SILVA, A.S.; FRANÇA, R.T.; TANIWAKIA, A.S.; DALL'AGNO, B.; RECK, J.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliosis. **Ticks and Tick-borne Diseases** v. 9, n. 5, p. 1221-1234, 2018.

SOARES, R.; RAMOS, C.A.; PEDROSO, T.; BABO-TERRA, V.; CLEVELAND. H.; ARAÚJO, F. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul Brazil. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 301-306, 2017.

SOUSA, K. C. M.; COSTA, M. R.; MACHADO, R. Z.; FACCINI, J. L. H. Prevalência e fatores de risco para infecção por hemoparasitos em cães de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 33, n. 11, p. 1345-1352, 2013.

SOUZA, B.M.P.S.; LEAL, D.C.; BARBOZA, D.C.P.M.; UZÊDA, R.S.; ALCÂNTARA, A.C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M.B.; GONDIM, L.F.P.; FRANKE, C.R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

SPOLIDORIO, M.G.; MINERVINO, A.H.H.; VALADAS, S.Y.O.B.; SOARES, H.S.; NEVES, K.A.L.; LABRUNA, M.B.; RIBEIRO, M.F.B.; GENNARI, S.M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 214-219, 2013.

SZABÓ, M.PJ. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, n. 1, p. 909–916, 2001.

SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** v. 3, n. 27, p.1-9, 2013.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. Infectious Disease of the Dog and Cat. 2ª ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 473-481

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3, p. 223–230, 2006.

UENO, T.E.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; LABRUNA, M.B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UILENBERG, G.; FRANSSEN, F.F.J.; PERIÉ, N.M.; SPANJER, A.A.M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterlyx** v. 11, n.1, p. 33-40, 1989.

VIEIRA, T.S.W.J.; VIEIRA, R.F.C.; NASCIMENTO, D.A.G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDON, R.S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2011.

VILELA, J.A.R.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; FALQUETO, A.; SANTOS, H.A.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H. Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v. 35, n. 1, p. 63-68, 2013.

VIOL, M. A.; GUERRERO, F. D.; OLIVEIRA, B. C. M.; AQUINO, M. C. C.; LOIOLA, S. H.; MELO, G. D.; GOMES, A. H. S.; KANAMURA, C. T.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; LIMA, V. M. F.; BRESCIANI, K. D. S**.** Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, p. 3479-3484, 2016.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 307-317, 1997.

CAPÍTULO II

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DAS PRINCIPAIS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ARTRÓPODES EM CÃES ATENDIDOS EM UNIDADES PRIVADAS DE SAÚDE ANIMAL (UPSA) DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

As doenças transmitidas por artrópodes são cada vez mais frequentes e continuam a ser um problema grave e persistente para a saúde animal e humana, e algumas delas são consideradas zoonoses. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise soroepidemiológica das principais doenças parasitárias que acometem cães em ambiente urbano, por meio de um teste rápido tipo ELISA comercial.Um total de 1132 exames foram selecionados por conveniência de acordo com a rotina de atendimento das UPSAs. A soroprevalência de todos hemoparasitos: *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi* encontrados na população em estudo foi de 44,3% para pelo menos uma espécie de hemoparasito, sendo *Ehrlichia* spp. 33,3% o gênero com maior soroprevalência, seguida por *D. immitis* 7,1%, *Anaplasma* spp. 3,7% e *B. burgdorferi* 0,3%. Em relação as UPSAs em estudo, houve diferença significativa entre a soroprevalência de alguns hemoparasitos, sendo *Ehrlichia* spp. com maior prevalência na UPSA A (48,1%), *D. immitis* na UPSA C (21,6%) e *Anaplasma* spp. na UPSA D (8,0%). No total de hemoparasitos analisados, a UPSA A obteve a maior soroprevalência (54,1%) (*p-valor < 0,05*) diferindo das demais UPSAs.Em relação aos casos de coinfecções, a soroprevalência na população em estudo foi de 16,2% para pelo menos dois agentes analisados, sendo a maior soroprevalência de *Ehrlichia* spp. + *D. immitis* (17,9%), seguidos por *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. (11,6%) e a tripla coinfecção de *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.+ *D. immitis* (3,4%). Em relação as coinfecções, houve diferença entre as soroprevalências, sendo a UPSA C com maior soroprevalência para (*Ehrlichia* spp + *Dirofilaria immitis*) (17,9%) e (*Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *Dirofilaria immitis*) (3,4%). As coinfecções duplas totalizaram (14,7%) e as triplas um menor percentual (1,4%). No total de coinfecções analisadas, a UPSA C obteve a maior soroprevalência entre todas as coinfecções encontradas (29,8%). A Soroprevalência de *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria immitis* nas UPSAs A e C merecem destaque respectivamente, pois além da diferença entre as regiões estudadas (*p-valor < 0,05*), são um problema iminente de saúde pública. Os resultados mostram a importância de uma vigilância epidemiológica de vetores, devido área endêmica com prevalência alta uma vez que cada área apresentou casos distintos que mostram desinformação e ineficiência nas medidas de prevenção e controle de vetores.

Palavras-chave: soroprevalência, epidemiologia veterinária, ehrlichiose, dirofilariose, borreliose,anaplasmose

ABSTRACT

Arthropod-borne diseases are more and more frequente and continue to be a serious and persistent problem for animal and human health, since some of them are considered zoonoses. The objective of this work was to perform a seroepidemiological analysis of the main parasitic diseases that affect dogs in an urban environment, by means of a commercial rapid ELISA test. A total of one thousand one hundred and thirty-two tests were randomly selected according to ther outine of attending UPSA.The total seroprevalence of hemoparasites in the study population was 44.3% for at least one species of hemoparasites, being Ehrlichia spp. 33.3% the genus with the highest seroprevalence, followed by *D. immitis* 7.1%, *Anaplasma* spp. 3.7% and
B. burgdorferi 0.3%. Regarding the UPSA under study, there was a significant difference between the seroprevalence of some hemoparasites, being *Ehrlichia* spp.with higher prevalence in UPSA A (48.1%), *D. immitis* in UPSA C (21.6%) and *Anaplasma* spp. at UPSA D (8.0%). In the total of hemoparasites analyzed, UPSA A obtained the highest seroprevalence (54.1%) (p-value<0.05), differing from the other UPSA s. In relation to cases of co-infections, seroprevalence in the study population was 16.2% for at least two agents analyzed, with the highest seroprevalence of *Ehrlichia* spp. + *D. immitis* (17.9%), followed by *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. (11.6%) and the triple coinfection of *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + D. immitis (3.4%). Regarding co-infections, there was a difference between seroprevalences, with UPSA Chaving the highest seroprevalence for (*Ehrlichia* spp + *Dirofilaria immitis*) (17.9%) and (*Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.+*Dirofilaria immitis*) (3.4%). Double coinfections totaled (14.7%) and triples alower percentage (1.4%). In the total of coinfections analyzed, UPSA C obtained the highest seroprevalence among all coinfections found (29.8%) (p-value <0.05). Seroprevalence of *Ehrlichia* spp. (p-value<0.05) and *Dirofilaria immitis* (p-value<0.05) intherespective UPSAs deserveto behig hlighted, because in addition to the difference between the regions studied, they are an imminent public health problem. The results show the importance of an epidemiological surveillance for prevention and control, since each area presented a series of distinct cases that show inefficiency in the prevention and control measures of vectors.

Keywords: seroprevalence, veterinary epidemiology, ehrlichiosis, heartworm disease, borreliosis,anaplasmosis

1 INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses são doenças frequentemente diagnosticadas na rotina da UPSA de pequenos animais, com destaque para a espécie canina, sendo responsáveis por várias alterações clínicas e laboratoriais (FONSECA et al., 2017; BAHIENSE et al., 2020). São endêmicas em regiões tropicais e subtropicais, acompanhando a prevalência dos seus respectivos vetores (SZABÓ et al., 2013, RIBEIRO et al., 2017; BENDAS et al., 2019). Estas doenças são transmitidas principalmente por vetores artrópodes e são causadas por rickettsias, protozoários e nematoides filarídeos, sendo que as alterações clínicas e hematológicas podem ser inespecíficas, o que dificulta a obtenção de um diagnóstico preciso.

Dentre as principais rickettsias transmitidas por artrópodes, temos: *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., agentes etiológicos respectivamente da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) e Anaplasmose Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC); Já, o nematoide filarídeo, temos *Dirofilaria immitis* (LABARTHE et al., 2014; ARAÚJO et al. 2015; RIBEIRO et al., 2017). Além do que em cães, infecções concomitantes por hemaparasitos é frequentemente observada, pois muitas delas possuem o mesmo vetor (EREMEEVA et al., 1995; ALMOSNY, 2002; VILELA, et al., 2013; VIOL et al., 2016; DA SILVA et al., 2016; PAULINO et al., 2018; CASTRO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021).

Ehrlichia canis e *A. platys* são riquétsias intracelulares obrigatórias, sendo que a primeira apresenta tropismo por monócitos e neutrófilos e, a segunda, por plaquetas (RIKIHISA, 2000). Como o principal transmissor desses agentes tem-se o carrapato *Rhipicephalus sanguineus (s.l)* (LABRUNA; PEREIRA, 2001; SZABÓ et al., 2013; ROJAS et al., 2014), além da presença de outras espécies, que variam de acordo com a região (RIBEIRO et al., 2017). A gravidade da (EMC) está diretamente relacionada a cepa envolvida, o status imunológico do hospedeiro e a coexistência de outras hemoparasitoses (ROJAS et al., 2014). Os aspectos da patogenia da (EMC) estão relacionados com as fases da doença: aguda subclínica ou crônica. Durante a fase aguda aparecem os sinais clínicos inespecíficos como febre, corrimento nasal, anorexia, depressão, poliúria, polidipsia e linfadenopatia. A maioria dos animais sobrevive a fase aguda e desenvolvem em seguida a fase subclínica (ELIAS, 1991; HOKINS, 1991a; HOKINS, 1991b). A fase subclínica é caracterizada pela persistência do organismo e aumento do título de anticorpos séricos, refletindo desta forma a ineficácia do sistema imune de eliminar o agente infeccioso e a infecção. Os achados laboratoriais são semelhantes a fase aguda, principalmente trombocitopenia, anemia e leucopenia. Esta fase pode persistir por até 5 anos (HOKINS, 1991a; HOKINS, 1991b). Na fase crônica da doença, a erliquiose apresenta características de doença

imunomediada (HARRUS et al., 1998). Os sintomas mais comuns de erliquiose crônica são depressão, apatia, perda de peso crônica, mucosas hipocoradas, febre, edema periférico, petéquias equimoses, epistaxe. Podendo ocorrer infecções secundárias como pneumonia, glomerulonefrite, insuficiência renal, artrite, polimiosite e ataxia. Nesta fase hematúria e hematoquezia também pode ocorrer sendo manifestações comuns de erliquiose na fase crônica, devido persistência de trombocitopenia. Após esta fase podemos considerar fase terminal devido agravamento do quadro clínico e laboratorial do animal tendo como achado predominante a pancitopenia (ALMOSNY, 2002).

Os principais sinais clínicos da (TCC) são inespecíficos, como a depressão, febre, aumento generalizado de linfonodos, emaciação, e anorexia, apesar de na maioria dos casos, os animais apresentarem-se assintomáticos (WOODY; HOSKINS, 1991; HARVEY, 2011; LI et al., 2015). Trombocitopenia, anemia (DAGNONE et al., 2003), macroplaquetas, e monocitose (HARRUS et al., 1997) são os achados laboratoriais mais comuns. Anteriormente, foi relatado que a diminuição na produção de plaquetas, não esteve associada com a infecção por *A. platys* porque esta bactéria não havia sido encontrada em megacariócitos (RUSSEL; GRINDEM, 2000). No entanto, um estudo mais recente mostrou que *A. platys* pode infectar megacariócitos, que são células precursoras de plaquetas (TOMMASI et al., 2014) derivadas de células-tronco pluripotentes da medula óssea. Embora a trombocitopenia seja um achado comum associado com a infecção por *A.platys*, este não é patognomônico das rickettsioses (FERREIRAet al., 2008a), podendo incluir *E. canis* como diagnóstico diferencial (DAGNONE et al., 2003; RAMOS et al., 2009)

Dirofilaria immitis, nematoide filarídeo que causa doença parasitária cardiopulmonar em canídeos domésticos e silvestres, são considerados os hospedeiros naturais e principais reservatórios. Embora possam acometer outros mamíferos, incluindo humanos, neste caso considerado como uma zoonose (ALMOSNY, 2002). O parasita *D. immitis* apresenta distribuição cosmopolita, sendo que, há maior prevalência em regiões litorâneas de clima quente. (LABARTHE et al., 2014). A doença é transmitida por várias espécies de dípteros da família Culicidae, denominados de “mosquitos”, carreadores de microfilárias, forma infectante ao hospedeiro vertebrado. As microfilárias penetram no tecido subcutâneo e muscular do hospedeiro vertebrado, através do ato do hematofagismo do hospedeiro invertebrado. Nos vasos sanguíneos, atingem o coração, mais especificam ente no ventrículo direito, as artérias pulmonares, e ocasionalmente a veia cava caudal, veia hepática e veias coronárias, em um período de 90 a100 dias após a infecção, tornando-se parasitos adultos (NELSON & COUTO, 2005; MATTOS JUNIOR, 2008). Após o acasalamento entre machos e fêmeas, estas liberam

microfilárias na circulação sanguínea, que são diagnosticadas em quantidades variadas no hospedeiro vertebrado. As lesões causadas pelos parasitas iniciam-se quando endotélio das artérias pulmonares é traumatizado mecanicamente pelos vermes adultos, havendo descamação endotelial o que estimula adesão e ativação de plaquetas e aderência de neutrófilos e macrófagos ativados. O endotélio lesado, antes impermeável, permite a passagem de proteínas séricas e fluido plasmático, levando a alterações endoteliais e parenquimatosas tais como hiperemia, edema e inflamação (RAWLINGS, 1980; MUPANOMUNDA et al., 1997). Estas alterações endoteliais aumentam a resistência da circulação pulmonar, servindo de estímulo para dilatação e hipertrofia progressivas do coração direito (LOMBARD, 1987).

A prevalência da dirofilariose canina varia de acordo com a localização geográfica, população e espécies de dípteros, população canina desprotegida, número de cães microfilarêmicos, técnica diagnóstica inserida, idade, comprimento e cor da pelagem, assim como também o manejo dos animais. (LABARTHE et al., 2014). O diagnóstico laboratorial da dirofilariose em animais é realizado pela identificação morfológica de microfilárias ou pela detecção de antígeno no sangue. A recomendação para o diagnóstico, é que dois métodos sejam usados, principalmente porque até 30% dos cães podem estar com "infecção oculta", ou seja, animais amicrofilarêmicos desenvolvem infecções que pode ser causada por helmintos imaturos em filhotes com menos de seis meses de idade, infecções por um único helminto, infecções com um único sexo de helminto, além de reações imunológicas do hospedeiro contra as microfilárias (LABARTHE et al.,1997; FERNANDES et al.,1999; SOUZA ;LARSSON, 2001; MCCALL et al., 2008; TRANCOSO, et al., 2020).

Borreliose de Lyme (BL), causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), quando infecta animais geralmente é assintomática, contudo, quando surgem manifestações, tais como: febre e claudicação são comuns a outras doenças, o que dificulta o diagnóstico clínico. Estas manifestações podem surgir cerca de dois a cinco meses após a infeção (FRITZ, KJEMTRUP, 2003; Apud LITTMAN et al., 2006).

A relevância dos estudos frequentes de hemoparasitoses encontra-se principalmente aos danos causados ao hospedeiro, devido à patogenia e as fases da doença que, muitas das vezes, impedem que um diagnóstico correto seja emitido. A sensibilidade dos testes para determinada fase da doença, aos sinais e sintomas inespecíficos quando presentes, além de fase subclínica, fazem com que o animal permaneça por um longo período assintomático, e quando há manifestações clínicas, é considerada como a fase crônica da doença de má prognóstico levando muitas vezes o animal ao óbito (SHIPOV et al., 2008, DAS & KONAR, 2013; ROJAS et al., 2014; TRANCOSO et al., 2020; MEDEIROS et al., 2020).

As técnicas de diagnóstico destinadas para hemoparasitoses vêm se aperfeiçoando significativamente; a maioria dos cães acometidos apresentam sintomatologias inespecíficas, e o diagnóstico através do exame clínico é considerado limitado. Sendo assim, testes de diagnósticos fáceis e de rápido manuseio, tornam-se essenciais para melhorar a eficiência do diagnóstico de animais portadores, já que a pesquisa desses parasitas no exame microscópico é demorada e de baixa sensibilidade. Portanto, o objetivo principapl deste trabalho, foi determinar a soroprevalência das principais hemoparasitoses que acometem cães pertencentes à zona oeste do município do Rio de Janeiro, utilizando o kit comercial SNAP 4Dx Plus® (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA), que é utilizado para a triagem na rotina das UPSAs para detectar antígeno de *D. immitis*, e anticorpos para *A. phagocytophilum* / *A. platys*, *B. burgdorferi*, *E. canis* / *E. ewingii*. Além da soroprevalência, verificar se há associação concomitante de hemoparasitos de acordo com as regiões de localização dos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Locais do estudo

O estudo reuniu informações de resultados de diagnósticos provenientes de prontuários de cinco UPSAs localizadas em diferentes bairros da Zona Oeste do município do Rio de Janeiro, Brasil. O número amostral de cada UPSA, com as suas respectivas localizações, encontra-se na Figura 1.

2.2. Coletade Dados

A coleta das amostras foi realizada por conveniência, onde os resultados dos testes sorológicos estavam descritos em prontuários eletrônicos e foram selecionados de acordo com a demanda de atendimento nas UPSAs. Como na rotina das UPSAs, o percentual de animais que chegam para checkup é muito baixo, logo todos os animais selecionados apresentavam sinais clínicos sugestivos de hemoparasitoses. No total foram utilizadas cinco UPSA, denominadas de: A, B, C, D e E em diferentes bairros no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2020. O número mínimo de prontuários foi determinado pela fórmula $n= z^2_{\alpha/2}P (1 - P) /\varepsilon^2$, segundo Medronho et al. (2009). Onde n= Amostra; $z_{\alpha/2}$=1,96 (valor da distribuição normal padronizada); P = prevalência esperada e ε^2 = erro tolerável de 5%. A prevalência esperada utilizada foi obtida pela média de (50%). Na amostragem final foram selecionados 1.132 testes rápidos SNAP 4Dx Plus (IDEXX Laboratories).

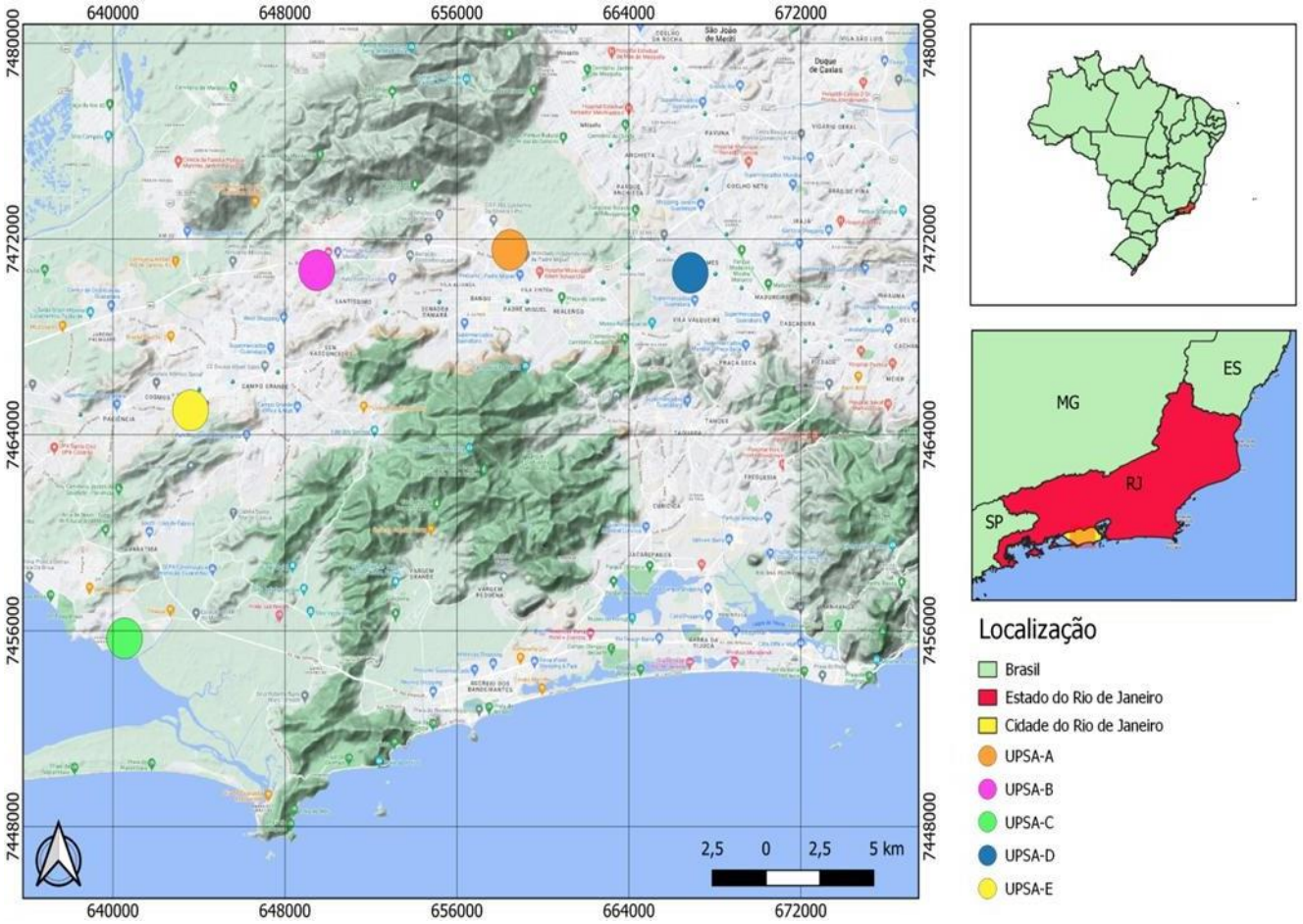


Figura 1. Localização das cinco Unidades Privadas de Saúde Animal (UPSA), localizadas na zona oeste do município do Rio de janeiro.

Tendo em vista as particularidades de climas na cidade do Rio de Janeiro, são identificadas na Zona Oeste, 3 tipos locais de clima: o “clima de vale”, situado na baixada de Bangu; o “clima litorâneo” identificados nas baixadas de Guaratiba e Santa Cruz e o “clima de altitude” encontrado nas áreas mais íngremes dos maciços (LUCENA, 2015).

A UPSA-A está localizada na área do bairro de Bangu, em área urbana com 5.320 habitantes / km² com área total de 45,7 km² e possui clima quente com médias térmicas de 25ºC. Devido à sua localização geográfica, estando numa baixada, entre os maciços da Pedra Branca e de Gericinó, e distante do litoral impedido do efeito ameno da brisa marítima e desprovido de mata densa o que acarreta em ilhas de calor. Bangu é conhecido por registrar altas temperaturas e os mais baixos índices pluviométricos, sobretudo nas estações de primavera e verão, quando geralmente os termômetros chegam a temperaturas próximas ou superiores a 40 °C (LUCENA, 2015).

A UPSA-B está localizada na área do bairro de Campo Grande em área urbana com 1.738,66 habitantes / km² com área total de 119 km² extensa e intensamente urbanizada, diferente da primeira área, conta com inúmeras áreas verdes localizadas inclusive em uma área comercial. Comparativamente com outras áreas, esta UPSA situa-se na transição desses fatores geográficos, responsável por um clima mais ameno (BRANDÃO, 1994; LUCENA, 2010).

A UPSA-C está localizada na área do bairro de Guaratiba em área urbana com 788,88 habitantes / km² com área total de 139,5 km² e possui clima ameno com médias de 19 ºC sendo o bairro mais extenso do município do Rio de Janeiro, porém um dos menos densamente povoados, apresentando uma vegetação rasteira e manguezais além de trilhas ecológicas com acesso ao Parque Estadual da Pedra Branca. Em suas encostas encontra-se a Mata Atlântica (LUCENA, 2015).

A UPSA-D está localizada na área do bairro de Marechal Hermes, localizado em área urbana com 12.355 habitantes / km² com área total de 3,89 km² e possui clima quente sendo um bairro estritamente residencial com ambientes mais edificados com maior concentração de poluentes sendo estas características urbanas e sobrepujaram os atributos geoecológicos, o que contribuiu para que se registrassem ilhas de calor noturno nesta região (BRANDÃO, 1994; LUCENA, 2015).

A UPSA-E está localizada a área do bairro de Inhoaíba, localizado em área urbana com 7.798 habitantes / km² com área total de 8,29 km² e possui clima ameno onde as áreas verdes estão mais preservadas, pois a ocupação urbana é menos intensa, se comparadas com as outras, como as UPSA-A, UPSA-B e UPSA-D. Porém, um dos fatores mais determinantes, é o fato

desses bairro estar próximo aos bairros costeiros, o que aumenta muito a umidade local, já que as massas de ar chegam pelo litoral e aumentam a ocorrência de pluviosidade nesta área o que é extremamente importante para o criatório de mosquitos e desta forma, apresentando diferentes aspectos epidemiológicos na ocorrência de patógenos em relação às outras áreas (LUCENA, 2010, 2015).

Todos os animais submetidos a este teste apresentaram no momento da consulta veterinária pelo menos três ou mais sinais sugestivos de hemoparasitoses (ALMOSNY, 2002; SILVA et al., 2016). Não foi possível comparar este grupo de animais com outro sem sinais de doença, para verificar doença subclínica, aguda e/ou crônica. Além desta limitação, também não foi possível autorização por parte dos tutores dos animais, a realização de diagnóstico utilizando metodologias moleculares, para detecção de doenças na fase aguda.

2.3. Procedimentos de diagnóstico

Neste estudo foi usado o teste rápido SNAP 4Dx Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA) que foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os testes foram realizados pelo médico veterinário no momento da consulta, que após o resultado, o tutor era comunicado do resultado e convidado a participar do estudo. Para realização do teste, foi adicionado ao microtubo estéril, três gotas de soro canino que foram misturadas com quatro gotas do conjugado que posterior mente foi adicionado ao poço de amostra do dispositivo SNAP. Assim que o mistura de amostra-conjugado atinge o círculo de ativação, o dispositivo era ativado. Era feita a leitura visualmente, 8 min após ativar o dispositivo. O desenvolvimento de cor na amostra foi indicativo de reação positiva. A sensibilidade e a especificidade do teste SNAP 4Dx Plus para cães é 99% e 99,3% para dirofilariose, 90,3 a 94,3% para anaplasmose, 94,1 e 96,2 % para a doença de Lyme, e 97,1 e 95,3 % para erliquiose (IDEXX Laboratories, Inc.).

O ensaio rápido baseado é uma tecnologia de imunocromatografia em dupla lavagem altamente específico e sensível (SNAP 4Dx Plus), e usado para triagem de soros caninos para antígeno ou anticorpos para seis patógenos transmitidos por artrópodes. Este ensaio detecta o antigeno de *D. immtis* e anticorpos para específico *E. ewing*, *E. canis*, *A. phagocitophilum*, *A. platys*,*B.burgdorferi*

2.4. Análise estatística

O teste de diferença entre proporções o Prop Test (AGRESTI, 2012) foi utilizado para verificar se houve diferença estatística entre as soropositividades para cada hemoparasitose entre as áreas de estudo, utilizando o programa R versão 3.6 (R CORE TEAM, 2019).

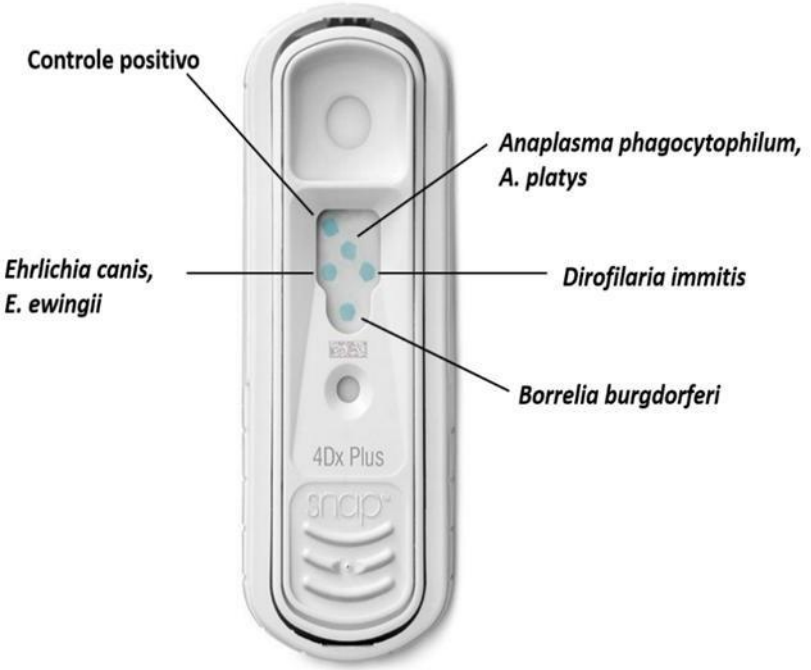


Figura 2. Resultados que podem ser obtidos no teste rápido Snap 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA) (Adaptado: https://www.idexx.com.br/pt-br/veterinary/snap-tests/snap-4dx-plus-test).

2.5. Aprovação do Comitê de Bioética

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), Brasil. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob protocolo nº. 7113280818 (Anexo 1).

3 RESULTADOS

No total de 1.132 amostras analisadas, 684 foram positivas, sendo 501 com pelo menos 1 agente infeccioso e 183 para pelo menos dois agentes infecciosos causando coinfecção. As amostras que foram soronegativas representaram um total de 448 amostras. A soroprevalência de hemoparasitos na população em estudo foi de 44,3% para pelo menos uma espécie de

hemoparasitos, sendo *Ehrlichia* spp. 33,3 % o gênero com maior soroprevalência, seguida por *D. immitis* 7,1%; *Anaplasma* spp. 3,7% e *B. burgdorferi* 0,3%. Em relação às localidades, houve uma diferença entre a soroprevalência total dos hemoparasitos, sendo que a UPSA-A obteve maior prevalência, seguido das UPSAs D, C, E e B. Dentro das UPSAs, houve diferença entre as prevalências dos hemoparasitos, sendo *Ehrlichia* spp. com maior prevalência na UPSA A (48,1%), *D. immitis* na UPSA C (21,6%) *Anaplasma* spp. na UPSA D (8,0%) e *B. burgdorferi* não apresentou diferença entre as UPSAs estudadas. No total de hemoparasitos, a UPSA-A obteve a maior soroprevalência (54,1%) em relação as UPSAs B e E (Tabela 1).

No estudo da soroprevalência entre as UPSAs, quando analisamos o perfil de *Ehrlichia* spp.houve diferença significativa entre as UPSAs (A e B), (A e C), (A e E), (B e D), (B e E), (C e D) e (C e E). Entretanto, no perfil de *Anaplasma* spp. foi diferente significativamente apenas entre as UPSAs (B e D) e (C e D). Já para *D. immitis* apresentou diferenças significativas entre algumas UPSAs, sendo estas: (A e C), (B e C), (C e D) e (C e E). Após as análises do perfil de *B.burgdorferi*, não houve diferença entre as UPSAs analisadas (Tabela 2).

Em relação aos casos de coinfecção, a soroprevalência na população estudada foi de 16,2% para pelo menos dois agentes etiológicos analisados. As coinfecções foram maiores para *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp; seguido por *Ehrlichia* spp. + *D. immitis* e por *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *D. immitis*. Ao observarmos essas infecções entre as UPSAs, verificou- se que este perfil foi maior para a soroprevalência de *Ehrlichia* spp. + *D. immitis* (17,9 %) na UPSA C, seguidos por *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. (11,6 %) na UPSA D e *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *D. immitis* (3,4 %) na UPSA C.

Houve diferença entre as soroprevalências também nas coinfecções, sendo que a UPSA-C apresentou a maior soroprevalência para a presença de dois (17,9 %) e três agentes (3,4%). As primeiras coinfecções foram representadas por (*Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.), (*Ehrlichia spp.*+ *Dirofilaria immitis*) e (*Anaplasma spp.* + *Dirofilaria immitis*) totalizando (14,7%) e a segunda representada por (*Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *Dirofilaria immitis*) com um menor percentual (1,4 %). No caso do total de coinfecções analisadas, a UPSA-C obteve a maior soroprevalência entre todas as coinfecções encontradas (29,8 %) (Tabela 3).

Na figura 2, encontram-se as imagens de amostras positivas de cães utilizando o kit do teste rápido SNAP4Dx Plus, evidenciando positividade para antígeno de *D.immitis*, e anticorpos para *A. phagocytophilum* / *A. platys*, *B. burgdorferi*, *E. canis* / *E. ewingii.*

Tabela 1. Soroprevalência das principais hemoparasitoses que acometem os cães provenientes de cinco UPSAs Veterinárias de diferentes bairros da zona oeste do Rio de Janeiro, através do "kit" de diagnóstico Snap 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA).

Hemoparasitos	UPSA-A n/N* P (%)**	UPSA-B n/N P(%)	UPSA-C n/N P (%)	UPSA-D n/N P (%)	UPSA-E n/N P (%)	Total n/N P(%)
Ehrlichia spp.	105/218 (48,1)**a**	60/254 (23,6)**b**	67/268 (25,0)b	56/138 (40,6)**a**	89/254 (35,0)**c**	377/1132 (33,3)
Anaplasma spp.	7/218 (3,2)**a**	7/254 (2,8) **a**	8/268 (3,0)a	11/13 (8,0)**ab**	9/25 (3,5) **a**	42/113 (3,7)
Dirofilaria immitis	5/218 (2,3) **a**	5/254 (2,0)**a**	58/268 (21,6)b	1/138 (0,7)**ac**	11/254 (4,3)**ad**	80/1132 (7,1)
Borrelia burgdorferi	1/218 (0,5)**a**	1/254 (0,4) **a**	0/268 (0,0)a	1/138 (0,7)**a**	0/25 (0,0)**a**	3/1132 (0,3)
Total	118/218 (54,1)	72/254 (28,4)	133/268 (49,6)	69/138 (50,0)	109/254 (42,9)	501/1132 (44,3)

*Razão entre animais soropositivos (n) e população de cães (N) nas UPAS A,B,C,D eE respectivamente.
**Soroprevalência dos hemoparasitos encontrados em cada UPSA.Letras iguais na mesma linha (p>0,05)

Tabela 2. Soroprevalência das principais coinfecções de hemoparasitos que acometem os cães em cinco UPSAs Veterinárias de diferentes bairros da zona oeste do Rio de Janeiro, através do "kit" de diagnóstico Snap 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA).

Coinfecções	UPSA - A n/N*P (%)**	UPSA-B n / NP (%)	UPSA-C n/NP (%)	UPSA-D n/NP (%)	UPSA-E n/N P(%)	Total n/N P(%)
Ehrlichia spp.+ *Anaplasma* spp.	19/218 (8,8)**a**	23/254 (9,0)**a**	21/268 (7,8)**a**	16/138 (11,6)**a**	10/254 (4,0)**b**	89/1132 (7,9)
Ehrlichia spp. + *Dirofilaria immitis*	1/218 (0,5)**a**	7/254 (2,8)**a**	48/268 (17,9)**b**	3/138 (2,2)**a**	14/254 (5,5)**c**	73/1132 (6,4)
Anaplasma spp. + *Dirofilaria immitis*	1/218 (0,5)**a**	0/254 (0,0)**a**	2/268 (0,7)**a**	2/138 (1,4)**a**	0/254 (0,0)**a**	5/1132 (0,4)
Ehrlichia spp.+ *Anaplasma* spp. + *Dirofilaria immitis*	1/218 (0,5) **a**	2/254 (0,8)**a**	9/268 (3,4)**a**	0/138 (0,0)**a**	4/254 (1,6)**a**	16/1132 (1,4)
Total	22/218 (10,1)	32/254 (12,6)	80/268 (29,8)	21/138 (15,2)	28/254 (11,0)	183/1132 (16,2)

* Razão entre animais (n) e população de cães (N) ; Letras iguais na mesma linha (p>0,05)

.



Figura 3. Amostras de cães utilizando o kit do teste rápido SNAP 4Dx Plus. 1-Amostra negativa; 2 - Amostra positiva para *Ehrlichia* spp.; 3 - Amostra positiva para *Anaplasma* spp.; 4 - Amostra positivo *D. immitis*; 5 - Amostra positiva para *B. burgdorferi*; 6 - Amostra positiva para *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.; 7- Amostra positivo para *Ehrlichia* spp. + *D. immitis*; 8 – Amostra positiva para *Anaplasma* spp + *D. immitis*; 9 - Amostra positivo para *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *D. immitis.*

No estudo da soroprevalência das coinfecções entre as UPSAs, ao analisamos o perfil de *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp., houve diferença significativa entre as UPSAs (B e E) e (D e E). Quando analisamos o perfil das coinfecções por *Ehrlichia* + *D. immitis* podemos observar diferença significativa a nível de 5% entre as UPSAs (A e C), (A e E), (B e C), (C e D) e (C e E). As coinfecções representadas por *Anaplasma* spp. + *D. immitis* e *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *D. immitis* não apresentaram diferença entre soroprevalências das UPSAs avaliadas (Tabela 4).

4 DISCUSSÃO

Estudos de soroprevalência são de suma importância para avaliar o perfil de diferentes agentes infecciosos, principalmente estudos epidemiológicos de hemoparasitos que acometem cães no ambiente urbano. Atualmente vem crescendo a necessidade tanto pela comunidade cientifica, pelos profissionais de saúde e assim como pelos responsáveis dos animais na busca pelo teste de diagnóstico confiável para qualquer enfermidade que acomete seus animais aliado ao custo-benefício.

Nesse contexto, o nosso trabalho apresentou animais sororeagentes para *Ehrlichia* spp. (33,3%) com valores semelhantes aos trabalhos realizados em diversos estados brasileiros (CARLOS et al., 2011; VIEIRA et al., 2013; GUEDES et al., 2015 e ROTONDANO et al., 2015). Sendo considerada endêmica em ambiente urbano e regiões tropicais e subtropicais (FONSECA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017) esta hemoparasitose apresentou diferença significativa entre as UPSAs, provavelmente pelas particularidades de cada área geográfica e dos cães atendido em cada UPSA. Mesmo em ambiente urbano e o cão sendo exposto ao mesmo vetor, o carrapato *R. sanguineus*s (s.l.), as diferenças existentes entre as prevalências podem ser explicadas pelas particularidades inerentes aos hospedeiros e ao ambiente como: período de incubação da doença, idade dos animais, status sorológico, recidiva da enfermidade, fase clínica, subclínica ou crônica da doença além de área rural ou urbana além das medidas de prevenção e controle (COSTA-JUNIOR et al., 2007; LABARTHE et al., 2014).

É válido lembrar que apesar de diferenças entre as UPSAs devido o perfil do hospedeiro Anticorpos (Ac) anti- *Ehrlichia* foram mais prevalentes entre todos os demais hemoparasitos estudados dentro de cada UPSA, corroborando os estudos de *Ehrlichia* spp. sendo considerada endêmica em ambiente urbano (FONSECA et al., 2017) fato este que não deve ser negligenciado. Ao considerarmos o diagnóstico de *Ehrlichia* spp. sem considerar as coinfecções, e se adicionarmos os dados (Tabela 1 e 2) os resultados são maiores. A prevalência aumentaria em 9,7 %, passando de 48,1 % para 58,1% no Bairro de Bangu. Esses dados mostram uma doença endêmica com prevalência expressiva de mais de 50 % da população de cães em estudo.

A soroprevalência de *Anaplasma* spp. foi baixa em todas as UPSAs analisadas apresentando diferença somente entre as UPSAs (B e D; C e D) (Tabela 2). Apesar de ser incriminado o mesmo vetor, *R. sanguineus (s.l.)* para ambas as bactérias (*E. canis* e *A. platys*.) este resultado, requer novas investigações sobre o possível vetor competente

envolvido, devido sua baixa prevalência nas regiões urbanas estudadas, em comparação com áreas rurais que tem sua prevalência maior (COSTA-JUNIOR et al., 2007) levantando a hipótese de um novo hospedeiro em ambiente urbano participando na biologia da transmissão. Ainda não foi comprovada a transmissão desta bactéria por *R.sanguineus (s.l.)* (SIMPSON et al., 1991) sendo verificado na literatura que piolhos no período do inverno onde a prevalência de detecção de *A. platys* é maior e a infestação por piolhos em filhotes de cães sobressai em relação ao *R. sanguineus (s.l.)* (BROWN et al.,2005) e além disso as pulgas (PEREZ-OSORIO et al., 2008) assim como outros carrapatos ixodideos como *Ixodes nepponensis, Haemaphysalis longicornis* (CHAE et al., 2008), podem ser considerados potenciais vetores incriminados nessa transmissão. Um estudo de epidemiologia molecular (RIBEIRO et al. 2017), verificou prevalência maior de *A. platys* em cães não domiciliados em ambiente rural no inverno, enfatizando que cada vez mais surgem evidências da participação de um vetor diferente de *R. sanguineus* sensu lato, necessitando de que esta hipótese seja comprovada. Em estudo recente os autores verificaram prevalência maior de *A. platys* (18,28 %) em relação a *E. canis (*0 %), B. *vogeli* (3,42 %) e *Mycoplasma* spp. (7,41 %) detectados pela PCR no estado do Paraná (BAHIENSE et al., 2020).

Diante deste fato métodos moleculares são aliados para detecção dos diversos hemoparasitos em cães para estudos epidemiológicos. Sabe-se que estudos epidemiológicos utilizam em sua maioria os métodos sorológicos para detecção do agente pesquisado como objetivo de triagem, entretanto no meio acadêmico e na comunidade científica , o uso dos kits tipo ELISA modificado, comercializados no Brasil e utilizados neste estudo ("kit" Snap 4Dx Plus® IDEXX), apresenta uma característica que compromete a eficiência no diagnóstico sugerindo que podem ocorrer reações cruzadas entre *A. platys* e *A. phagocytophilum* ou *E. canis* e *E. ewingi,* informação fornecida pelo fabricante do kit, como também na lliteratura cientifica (RIKIHISA et al., 1994; BREITSCHWERDT, 2013). Entretanto, como os outros agentes, que seriam possíveis causadores de reação cruzada não são endêmicos no Brasil, poucas chances de estarmos dainte de soroprevalência de *E. ewingi* e *E. chaffensis*, somente com exceção de *A. phagocytophilum* que já foi detectado DNA em carrapatos e sangue de cães em Seropédica/ RJ (SANTOS et al., 2013).

Analisando o papel desse kit de diagnóstico ELISA Snap 4Dx Plus® IDEXX, no primeiro momento em que o animal chega à UPSA com sinais sugestivos de hemoparasitoses e o teste é oferecido e temos como resultado positivo para *Ehrlichia* spp. por exemplo, a rapidez e agilidade em obter o diagnóstico e oferecer este serviço para o animal e o responsável é essencial para conduzir o tratamento adequado, deixando claro que exames

complementares serão necessários para acompanhar a evolução da doença e que uma vez utilizado esse teste no segundo momento de recidiva ou presença de novos sinais de infecção, exames de biologia molecular serão necessários para diferenciar doença aguda ou crônica, visto que esse teste pode manter resultado falso positivo por até 5 anos (HOSKINS, 1991) em virtude de cicatriz sorológica, devido aos anticorpos circulantes, ou ineficácia do organismo imunocompetente em debelar a infecção, permitindo desta forma detecção de altos títulos de anticorpos (ALMOSNY, 2002). Existe também a possibilidade de reinfecção em cães que tem acesso a rua, que podem sofrer nova infestação ou picada de um carrapato infectado, não perceptível ao tutor, sendo responsável por manter a meia vida de anticorpos nos referidos cães mantendo a sorologia positiva.

Dirofilaria immitis, é um hemoparasito nematoide filarial presente em ambiente urbano e tem os mosquitos *Ochlerotatus taeniorhynchus, Culex quinquefasciatus* e *Ochlerotatus scapularis* da família Culicidae como principais vetores em região costeira (MCCALL et al., 2008; BENDAS et al.,2019) e na zona oeste do Rio de Janeiro (BENDAS et al.,2019). Em nosso estudo o bairro representado por esta região foi Pedra de Guaratiba, considerada região endêmica para este nematoide, apresentou diferença significativa e superior as outras UPSAs (21,6%) estudadas na zona oeste (Tabela 1), sendo esta prevalência bem próxima do valor do estudo realizado em Cabo Frio região dos lagos do estado do Rio de Janeiro (27,5%) (LABARTHE et al., 2014). Ao analisarmos as prevalências de *D. immitis* sem considerar as coinfecções, e se adicionarmos os dados (Tabela 1 e 2), os resultados são mais alarmantes. A prevalência aumentaria em 22%, passando de 21,6% para 43% de soroprevalência em Pedra de Guaratiba. O mesmo acontece nos casos de ehrlichiose, nesta região, desconsiderando as coinfecções, a prevalência aumentaria em 29,1%, passando de 25% para 54,1%. Uma das explicações para as diferenças entre as áreas e a as ocorrências das doenças analisadas, são os fatores geográficos do meio, como umidade, níveis de precipitações, relevo e a cobertura vegetal de cada área, o que colabora com a proliferação das principais doenças de ambiente urbano (JOJIMA et al., 2008, LUCENA, 2010, SZABÓ et al., 2013, ARAÚJO et al., 2015) tornando propicia sua difusão, ou simplesmente, sendo condições necessárias para a sobrevivência de seus hospedeiros urbanos e silvestres (BRANDÃO, 1994).

Ao analisarmos a soroprevalência entre as UPSAs em relação a positividade por *D. immitis* tanto a ausência como a presença de coinfecções, foram influenciadas pela UPSA C, localizada na região costeira, sendo uma das principais áreas endêmicas da zona oeste influenciando desta forma o resultado de todas as UPSAs com a prevalência de *D. immitis* sem coinfecções de 21,6 % e com coinfecções de 17,9% (Tabela 1 e 2).

O mapeamento descrito no trabalho de Lucena (2010) feito pela Secretaria Municipal do Meio Ambiente mostra que a Zona Oeste detém o maior espaço preservado da cidade do Rio de Janeiro. Sendo que o bairro mais verde da cidade é Guaratiba, com 6.967 hectares cobertos por vegetação.Sendo todos esses bairros pertencentes à mesma área administrativa (Zona Oeste) e as UPSAs já contam com esse fator geográfico em comum, a presença de matas e florestas.

Porém, presença se faz maior em algumas áreas como as UPSAs E e C, nas quais as áreas verdes estão mais preservadas, pois a ocupação urbana é menos intensa, se comparadas com as outras, como as UPSAs A, B e D. Porém, um dos fatores mais determinantes, é o fato desse bairro ser um bairro costeiro, o que aumenta muito a umidade local, já que as massas de ar chegam pelo litoral e aumentam a ocorrência de pluviosidade nesta área o que é extremamente importante para a proliferação de mosquitos da família Culicidae principal vetor deste filarídeo (LABARTHE et al., 2014; TRANCOSO et al., 2020) sem contar com saneamento básico precário e alguns locais inexistente, valas negras, manguezais, restingas e esgoto a céu aberto nas proximidades das residências, havendo desta forma o confronto entre grande beleza natural da paisagem alternando-se com processos de favelização e loteamentos de alto luxo, como reflexo de urbanizações descontroladas (BRANDÃO, 1994; COSTA; MOURA, 2003; LUCENA, 2010).

Para as UPSAs A, B e D, outros fatores geográficos podem ser levantados como hipóteses para a diferença nas prevalências das hemoparasitoses, como a umidade relativa do ar e a temperatura média. No caso da UPSA A, localizada em uma região de vale, situado entre os maciços da Pedra Branca e do Gericinó, este fator geográfico conta com barreiras orográficas que acabam bloqueando a passagem de ar e colaborando para as altas temperaturas marcadas constantemente neste bairro (BRANDÃO, 1994; LUCENA, 2010). As UPSAs A e D estão muito próximas geograficamente, mas no caso da UPSA A, o calor nesta área é mais intenso do que da UPSA D, em partes por que a UPSA A passou por um processo acelerado de expansão da malha urbana, o que diminui as áreas verdes, se comparado a UPSA D, onde em algumas partes, elas se encontram mais preservadas (ABREU, 1992, LUCENA, 2010).

A UPSA-B, localizada em um lugar muito extenso, intensamente urbanizado, mas também conta com inúmeras áreas verdes, está localizada inclusive perto de uma área comercial o com o Shopping Center. Comparativamente com outras áreas, esta UPSA situa-se na transição desses fatores geográficos. Nesta região as áreas verdes não são tão presentes quanto as UPSAs C e E, mas são mais presentes do que UPSAs A e D. A UPSA-B, não tem a

mesma umidade que UPSA-C e E, mas tem uma umidade relativa maior do que UPSAs A e D, onde as temperaturas são mais elevadas, em especial na UPSA-A (BRANDÃO,1994; LUCENA,2010).

No estado do Rio de Janeiro, antes da primeira quimioprofilaxia ser utilizada no Brasil, uma pesquisa mostrou prevalência da dirofilariose foi16,85% ou seja, 8,61% dos cães em Município do Rio de Janeiro e 21,76% no município de Niterói (LABARTHE et al., 1997). Anos mais tarde, após o lançamento da quimioprofilaxia no Brasil, as infecções por dirofilariose canina tornaram-se raras (2%), mesmo quando os testes de antígeno eram usados em antigas áreas hiperendêmicas (LABARTHE et al., 2003). A partir de 2010, a prevalência voltou a aumentar e um levantamento de atualização realizado na região dos lagos do estado do Rio de Janeiro, que inclui os municípios de Araruama, Cabo Frio, Iguaba, São Pedro da Aldeia e Arraial do Cabo, mostraram que frequências antigênicas de 27,5% e 62,2% foram observadas em CaboFrio e Armações dos Búzios, respectivamente (LABARTHE et al., 2014).Esse estudo corrobora com os resultados de nosso trabalho com prevalência semelhante de *D.immitis* com 21,6% sem coinfecções (Tabela 1e 2).

A quimioprofilaxia relatada por Labarthe et al.(2003) foi responsável pela queda brusca da prevalência da dirofilariose na cidade do Rio de Janeiro por umtempo determinado, mas não se manteve principalmente pela falha no tratamento ou abandono por partes dos proprietários dos animais, que até hoje é comum relatos do tipo no momento da consulta: "Não consegui manter o tratamento com aquele comprimido ou esqueci de comprar aquele comprimido ..." além da associação das pipetas repelentes para o mosquito vetor (GENCHI et al., 2019) que grande parte dos proprietários dos cães assistidos em todas as UPSAs analisadas, relatam em nosso estudo, que não fazem uso no seu animal devido ao custo elevado em manter esta terapêutica tópica. Este fato torna uma barreira para a eficácia no tratamento e prevenção desses animais. Recentemente foram realizados trabalhos que mostraram resultados promissores de formulação a base de moxidectina injetável (ProHeart® SR-12) que antigamente era utilizada apenas como preventivo associada ao uso de doxiciclina oral e hoje já sabemos que tem ação curativa (ALBERIGI et al. 2019 e 2020).

A prevalência baixa de *D. immitis* nas UPSAs A, B e D estão relacionadas com casos não autóctones de animais que por algum momento em sua fase de vida jovem ou adulta se infectou em área endêmica e quando retorna para sua área não endêmica, recebe o diagnóstico positivo para dirofilariose. Na UPSA-A todos os animais positivos para *D. immitis* no SNAP 4DxPlus® eram de área não endêmica que por algum momento foi exposto na área costeira, possivelmente ficaram vários anos na forma subclínica e de repente em exames de rotina ou

até mesmo com surgimento de sinais clínicos, mas que aparecem e quando buscam a UPSA para uma consulta (SILVA et al., 2016), recebem diagnóstico inesperado de dirofilariose. Os casos com diagnóstico de coinfecções, que em nosso estudo foi maior na UPSA C (p-valor <0.05) e os casos de coinfecções triplas (*Ehrlichia* spp.+*Anaplasma* spp.+*Dirofilaria immitis*) formas mais prevalentes também na UPSA-C com 9 casos, mas sem diferença significativa em comparação com as demais áreas (Tabela 4).

Esses dados nos deixam um alerta a respeito de medidas preventivas eficazes, além de um trabalho de conscientização muito maior do que já existe no ambiente das UPSA, visto que sem essas ações, os animais ficam cada vez mais expostos a esses agentes infectocontagiosos. O grande entrave das medidas de profilaxia e controle são o custo elevado dos produtos comprovadamente eficazes, como exemplo temos recentemente uma formulação a base de moxidectina injetável (ProHeart® SR-12) que foi aprovada para uso tanto como profilático como curativo para a dirofilariose, (ALBERIGI et al. 2019 e 2020) aumentando a esperança de erradicação desta hemoparasitose. Entretanto, essa droga ainda não está acessível, para todos os proprietários de cães devido ao seu alto custo, principalmente em áreas endêmicas e carentes, por exemplo onde está localizada a UPSA C.

Do total de animais no estudo, somente três casos de soroprevalência de *B.burgdorferi* foram registrados: Foi encontrado um caso em cada UPSAs A, B e D. Diante deste resultado esperávamos casos clínicos e/ou sorológicos na UPSA-C devidos a um conjunto de fatores ambientais bem propícios para doenças transmitidas por vetores, além de altas prevalências das demais hemoparasitoses, entretanto este fato não foi observado. A respeito desta bactéria muitas considerações precisam ser levadas em pauta. Desde os seus primeiros relatos no Brasil em humanos (YOSHINARI et al. 2003; CORRADI et al., 2006), em cães (SOARES et al. 1999, JOPPERT et al., 2001; O'DWYER et al., 2004; CORDEIRO et al.,2012) em equinos (SALLES et al., 2002; MADUREIRA, 2004) e bovinos (FONSECA et al., 1996), muitas lacunas ainda existem para que possamos afirmar que *B. burgdorferi* está em circulação no território brasileiro causando doença.

No Brasil os primeiros estudos datam no final da década de 80, quando grandes especialistas em Borreliose de Lyme no mundo (YOSHINARI et al., 1989) observaram que pacientes brasileiros com os primeiros casos de manifestações sistêmicas (YOSHINARI et al., 1992) como doenças infecciosas e autoimunes ao realizarem sorologia para *B. burgdorferi* obtinham resultado positivo, evidenciando então cruzada (GOUVEIA et al., 2010). Desta forma viram a necessidade da criação de postulados, para que de forma prudente, pudessem

direcionar o diagnóstico e afirmar se o Brasil tinha ou não a doença de Lyme (YOSHINARI et al., 1992).

Entretanto foi observado que, muitos trabalhos foram publicados e algumas particularidades nos resultados são alvo de questionamentos, como: o relato de pacientes com resultados obtidos de Western blott com bandas positivas de IgG sem identificar quais eram as bandas específicas segundo recomendações do Center for Diseases Control (CDC) (YOSHINARI et al., 199); resultados de IgG na fase latente negativos além de diagnóstico de bilogia molecular negativos com ausência de isolamentos do agente em casos publicados como positivos (YOSHINARI et al., 1997).

No diagnóstico de borreliose de Lyme, alguns artigos indicam casos positivos por diagnóstico de biologia molecular com amostra de sangue, soro ou plasma que não é recomendado pelo CDC, devido a baixa sensibilidade e alta prvalência de falsos positivos (MANTOVANI et al., 2012; GONÇALVES et al., 2015; LOPES et al., 2017). Foi observado também isolamento de microorganismo imóvel (*B. burgdorferi* é móvel) e com período de incubação superior ao preconizado chegando a 3 meses, faltando caracterização molecular do agente isolado (ABEL et al., 2000).

Em outro trabalho para investigar ocorrência de *B. burgdorferi,* foi realizado isolamento de espiroquetas não cultiváveis com resultado de PCR para primers específicos para *B. burgdorferi* e outras Borrelias com resultados negativos em carrapatos e amostras biológicas (YOSHINARI et al., 2010). Outro estudo com amostras de animais da espécie *Leontopithecus chrysimelas* (mico leão dourado), o resultado de biologia mlecular apresentou 100% de homologia para *B. burgdorferi* não sendo relatado o controle positivo utilizado e qual a sequência foi depositada no GenBank (SANTOS et al, 2018).

Em 2020, um trabalho realizado com a coleta de 1873 carrapatos no Bioma Cerrado utilizou como gene alvo a flagelina E (flgE 262pb) não relatando controle positivo, sendo isolado *Borrelia* spp. apenas de um carrapato *Amblyomma sculptum* com sequência GenBank MK231014, similar as sequeências depositadas pela USP e similares as sequências dos controles positivos espalhados pelo Brasil, havendo grande probabilidade e especulações a respeito da contaminação de controle positivos que são responsáveis pelo diagnóstico de Lyme no Brasil (HIGA et al., 2020) .

Ainda no ano de 2020, um estudo que avaliaou competeñcia vetorial entre carrapatos ixodídeos e B. *burgdorferi* e foram encontrados como resultados que os gêneros *Amblyomma, Dermacentor, Haemaphysalis* não são bons vetores para doença de Lyme, porque possuem peptídeos antimicrobianos que causam lise na *B. burgdorferi*, impedindo sua multiplicação e

transmissão nesses carrapatos (EISEN, 2020).

No hemisfério Sul, apenas o isolamento da cultura de Borrelia do Grupo da febre maculosa *Borrelia currentis* (MUÑOZ-LEAL et al., 2018), e o isolado de *Borrelia theileri* de *Rhipicephalus microplus* (CORDEIRO et al., 2018) foram os únicos encontrados em carrapatos de animais domésticos podendo sugerir reação cruzada com dados sorológicos de animais domésticos (CORDEIRO et al., 2012) e humanos (YOSHINARI et al., 2003).

Diante dos trabalhos publicados, os postulados preconizados e as diretrizes atuais para orientações futuras para o diagnóstico laboratorial para a borreliose de Lyme no mundo existem algumas limitações (MARQUES, 2015, MOORE et al., 2016, LOHR et al., 2018).

Entretanto, diante de todos relatos e evidências científicas encontradas nos trabalhos supracitados, só nos resta considerar esses três casos de soroprevalência de *B. burgdorferi* no SNAP 4Dx Plus como prováveis casos de reação cruzada com outros agentes transmitidos por artrópodes (CORDEIRO et al., 2012; CORDEIRO et al., 2018) e ou outras doenças infectocontagiosas como leptospirose (GOUVEIA et al.,2010), visto também que, em UPSAs de ambiente urbano é comum esses cães serem vacinados com cepas múltiplas para diversas enfermidades virais e bacterianas inclusive sorovares para *Leptospira*s pertencente a familia Espiroquetaceae (SUEPAUL et al. 2010; RODRIGUES et al., 2013; BOUVET et al., 2016).

As diversas metodologias diagnósticas utilizadas na UPSA podem indicar infecções ou não, portanto a conduta clínica do médico veterinário é extremamente importante, sendo que uma única metodologia diagnóstica não é suficiente para obtermos um diagnóstico preciso, desta forma, exames complementares associados a biologia molecular e sorologia para fundamentar um diagnóstico definitivo torna-se imperativo (MEDEIROS et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

O teste rápido SNAP 4Dx PLUS é eficiente para a triagem dos principais hemoparasitos presentes na rotina das clinicas veterinárias da zona oeste do Rio de Janeiro, revelando que *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp e *Dirofilaria immitis* apresentam caracter endêmico com prevalências significativamente expressivas;

O teste rápido SNAP 4Dx PLUS é considerado um exame de rotina na clinica veterinária para o diagnóstico de erlichiose, anaplasmose e dirofilariose e somente válido nos casos em que precisamos da tomada de decisão para diagnóstico de hemoparasitoses em casos graves, desta forma permite que o tratamento seja instituindo com rapidez diante dos sinais clínicos evidentes e prognósticos;

Os casos de *B. burgdorferi* encontrados necessitam de confirmação com novos estudos de acordo com o concenso internacional, visto que esta bacteria ainda não foi isolada nem cultivada no Brasil;

Os casos de *D. immitis* encontrados nesse estudo corroboram com os estudos na região dos lagos com prevalência semelhante aos estudos de Labarthe et al. (2014).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N.H.; SCHUMAKER, T.T. Espiroquetas semelhantes a *Borrelia* recuperadas de carrapatos e pequenos mamíferos coletados na Reserva da Mata Atlântica, Condado de Cotia, Estado de São Paulo, Brasil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v**.** 95, 621-624, 2000.

ABREU, M. A. A cidade, a Montanha e a Floresta. In: ABREU, M, de A.: Natureza e Sociedade no Rio deJaneiro. Rio de Janeiro, Secretaria Municipal de Cultura, Turismo e Esportes, 1992, p. 54-103.

AGRESTI, A. Categorical Data Analysis. Hoboken: Jonh Wiley and Sons. 2012. ISBN 978-0-470-46363-5

ALBERIGI, B.; DE SOUZA, C.; FERNANDES, J.I.; MERLO, A.; LABARTHE, N. Use of slow-selease injectable moxidectin for treatment of *Dirofilaria immitis* infection during pegnancy. **Frontier Veterinary Science**, v. 6, n. 440, p. 1-4, 2019.

ALBERIGI, B.; FERNANDES, J.I.; PAIVA, J.P.; MENDES-DE-ALEMIDA, F.; KNACKFUSS, F.; MERLO, A.; LABARTHE, N.V. Efficacy of semi−annual therapy of an extended-releaseinjectable moxidectin suspension and oral doxycyclinein *Dirofilaria immitis* naturally infected dogs**. Parasites & Vectors**, v. 503, n. 13, p. 1-8, 2020.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In:. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. 1ª ed. Rio de Janeiro: **L.F.Livros**, 2002. p.13-56.

ARAÚJO, A.C.; SILVEIRA, J.A.G.; AZEVEDO, S.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; RIBEIRO, M.F.B.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n.5, p. 456-461, 2015.

BAHIENSE, C.R.; MATOS, A.C.; ABATE, H.L; SANTOS, N.J.R.; VIDOTTO, O. Occurrence
of *Babesia vogeli*, *Mycoplasma* spp., *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* spp. in a hospital dog population of western Paraná, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, supl. 2, p. 3133-3144, 2020.

BENDAS, A.J.R.; BRANCO, A.S.; SILVA, B.R.S.A.; PAIVA, J.P.; MIRANDA, M.G.N.A; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N.V. Mosquito abundance in a *Dirofilaria immitis* hotspot in the eastern state of Rio de Janeiro, Brazil, **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 18, n. 1, p. 1-4, 2019.

BOUVET, J.; CARIOU, C.; VALFORT, W.; VILLARD, S.; HILAIRE, F.; OBERLI, F.; CUPILLARD, L.; GUIGAL, P.M. Efficacy of a multivalent canine vaccine DAPPi-L multi against mortality, clinical signs, infection, bacterial excretion, renal transport and kidney damage caused by experimental Leptospira challenges, **Vaccine Report**, v. 6, n. 1, p. 23-28, 2016.

BRANDÃO, A. M. P. M. As Alterações Climáticas na Área Metropolitana do Rio de Janeiro: Uma provável influência do crescimento urbano. In: ABREU, M.de A. Natureza e Sociedade no Rio de Janeiro. R.J. Secretaria Municipal de Cultura, Turismo e Esportes, 1994, p.143-200.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; QUROLLO, B.A.; SAITO, T.B.; MAGGI,R.G.; BLANTON, L.S.; BOUYER, D.H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys, Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites & Vectors**, v.7, n. 298, p. 1-7, 2014.

BROWNG. K.; MARTINA. R.; ROBERTST. K.; DUNSTANR. H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. **Australian VeterinaryJournal**, v. 83, n. 1, p. 101-102, 2005.

CARLOS, R.S.A.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; ALMOSNY, N.R.P.; ALBUQUERQUE, G.R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasielira de Parasitologia Veterinaria**, v.20, n.3, p. 210-214, 2011.

CHAE, J.S.; YU, D.H.; SHRINGI, S.; KLEIN, T.A.; KIM, H.C.; CHONG, S.T.; LEE, I.Y.; FOLEY, J.Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-donearthe DMZ, Korea. **Journal Veterinary Science**, v. 9, n. 3, p. 285-293, 2008.

CORRADI, D.A.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D. Anticorpos para *Borrelia burgdorferi* em indivíduos que trabalham com animais silvestres. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 966–968, 2006.

CORDEIRO, M.D.; BAHIA, M.; MAGALHÃES-MATOS, P.C.; CEPEDA, M.B.; GUTERRES, A.; FONSECA, A.H. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 555-561, 2018.

CORDEIRO, M.D.; MEIRELES, G.S.; SILVA, J.B.; SOUZA, M.M.S.; FONSECA, A.H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 3, p. 251-256, 2012.

COSTA, V.C.; MOURA, J.R.S. Análise do potencial turístico nas regiões administrativas (RAs) de Campo Grande e Guaratiba zona oeste do Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Investigaciones geográficas**, v. 52, n. 1, p. 137-152, 2003.

COSTA-JUNIOR, L.M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M.F.B.; BEELITZ, P.; KURTPFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal** v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

DA SILVA, C.B.; SANTOS, H.A.; NAVARRETE, M.G.; RIBEIRO, C.C.D.U.; GONZA-LEZ, B.C.; ZALDIVA, M.F.; PIRES, M. S.; PECKLE, M.; DACOSTA, R.L.; VITARI, G.L.V. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba. **Tick and Tick Borne-Diseases**, v. 7, n. 2, p. 938-944, 2016.

EISEN, L.Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review. **Ticks Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, p.1-76, 2019.

EREMEEVA, M.; BALAYEVA, N.; ROUX, V.; IGNATOVICH, V.; KOTSINJAN, M.; RAOULT, D.Genomic and Proteinic Characterization of StrainS, a Rickettsia Isolated from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in Armenia, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p.2738–2744, 1995.

FERNANDES, C.G.N.; MOURA, S.T.; DIAS, A.R.; VIEIRA FILHO, W.S. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, estado de Mato Grosso – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.5, p.258-261, 1999.

FONSECA, J.P.; BRUHN, F.R.P.; RIBEIRO, M.J.M.; HIRSCH, C.; CHRISTIANE ROCHA, C.M.B.M.; GUEDES, E.; GUIMARÃES, A.M. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs **Ciência Animal Brasileira**, v.18, n. 1, p. 1-9, 2017.

FONSECA, A.H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; YOSHINARI, N.H.Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. **Revista Universidade Rural: Ciência da Vida**, v.18, n.1, p. 85-89, 1996.

FRITZ, C.L.; KJEMTRUP, A.M.Lyme borreliosis **Veterinary Medicine Today: Zoonosis Update**, v. 223, n. 9, p. 1261 – 1270, 2003.

MANTOVANI, E.; COSTA, I.P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V.L.N.; HIGUCHI, M.L.; YOSHINARI, N.H.Description of the syndrome similar to Lyme disease in Brazil. Is it a new tick-borne disease or a variation of Lyme disease, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 4, p. 443-456, 2007.

GENCHI, M.; VISMARRA, A.; LUCCHETTI, C.; VIGLIETTI, A.; CROSARA, S.; GNUDI, G. Efficacy of imidacloprid 10% moxidectin, 2.5% spot on (Advocate®, Advantage Multi®) and doxycycline for the treament of natural *Dirofilaria immitis* infections in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 273, n. 1, p. 1–22, 2019.

GONÇALVES, D.D.; MOURA, R.A.; NUNES, M.; CARREIRA, T.; VIDOTTO, O.; FREITAS, J.C. *Borrelia burgdorferi* sensu lato em humanos em área rural do Estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 571-575, 2015.

GOUVEIA, E. A.; ALVES, M.F.; MANTOVANI, E. Profile of patients with Baggio-Yoshinari Syndrome admitted at "Instituto de Infectologia Emilio Ribas", **Revista Instituto de Medicina Tropical**, v. 52, n. 6, p. 297-303, 2010.

GUEDES, P.E.B.; OLIVEIRA, T.N.A.; CARVALHO, F.S.; CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE, G.R.; MUNHOZ, A.D.; WENCESLAU, A.A.; SILVA, F.L. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brasil Brazilian **Journal Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 115-121. 2015.

HIGA, L.O.S.; CSORDA, B.G.; GARCIA, M.V.; OSHIRO, L.M.; DUARTE, P.O.; BARROS, C.J.; ANDREOTTI, R. Spotted fever group *Rickettsia* and *Borrelia* spp. cooccurrence in *Amblyomma sculptum* in the Midwest region of Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 441–455, 2020.

HOSKINS, J.D. Tick-borne Zoonoses: Lyme disease, Ehrlichiosis and Rocky Spotted Fever**.** **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal**, v.6, n.3, p. 236-243, 1991.

JOJIMA, F.S.; GARCIA, J.L.; VIDOTTO, M.C.; BALARIN, M.R.S.; FABRETTI, A.K.; GASPARINI, M.R.; COELHO, A.L.M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* spp. em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

JOPPERT, A.M.; HAGIWARA, M.K.; YOSHINARI, N.H. Antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 251-255, 2001.

DAS, M.; KONAR, S. Clinical and hematological study of canine Ehrlichiosis with other hemoprotozoan parasites in Kolkata, West Bengal, India, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 11, p. 913-915, 2013.

LABARTHE, N.V.; ALMOSNY, N.R.P.; GUERRERO, J.; DUQUE-ARAÚJO, A.M. Description of the occurrence of canine dirofilariosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n. 1, p. 47-51. 1997.

LABARTHE, N.V.; CAMPOS-PEREIRA, M.C.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A.; HOSKINS, J. Serologic Prevalence of *Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LABARTHE, N.V.; PAIVA, J.P.; REIFUR, L.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; MERLO, A.; CARVALHO PINTO, C.J. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having ahigh incidenceofheartworm-infected dogs. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 493, p. 1-8, 2014.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil.**ClínicaVeterinária**, v.6, n.30, p.24-32, 2001.

LITTMAN, M.P.; GOLDSTEIN, R.E.; LABATO, M.A.; LAPPIN, M.R.; MOOR, G.E. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Lyme Disease in Dogs: Diagnosis, Treatment, and Prevention, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 422–434, 2006.

LOHR, B.; FINGERLE, V.; NORRIS, D.E.; HUNFELD, KP. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.55, n. 4, p. 219-245, 2018.

LOMBARD, D.W. Heartworm disease. In: Bonagura J.D. Cardiology. Churchill Livingstone, New York, 275-299, 1987.

LOPES, F.A.; REZENDE, J.; SILVA, D.B.S.; ALVES, F.C.G.; OLIVEIRA, C.E.; COSTA, I.P. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients in Brazilian Central-Western region. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 6, p. 641-645, 2017.

LUCENA, A.J. O sistema clima urbano da zona oeste/RJ: Uma contribuição ao monitoramento e análise em sistemas ambientais, **Geoambiente**, n. 15, p. 1-20, 2010.

MADUREIRA, R.C. Freqüência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. 2004. 40p. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, Rio de Janeiro, 2004.

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R.G.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V.L.N.; YOSHINAR, N.H. Amplification of the flgE gene provides evidence for the existence of a brazilian borreliosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical SãoPaulo**, v.54, n.3, p.153-157, 2012.

MARQUES, A.R. Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. **Infectious Disease Clinics**, v. 29, n. 2, p. 295-307, 2015.

MCCALL, J.W.; GENCHI, C.; KRAMER, L.H.; GUERRERO, J.; VENCO, L. Heartworm disease in animals and humans. **Advances in Parasitology**, v. 66, n.4, p. 193-285, 2008.

MEDEIROS, M.A.S.; SILVA, M.H.; MATTA, M.A.V.; FERREIRA, E.O.; MACHADO, S.L.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B.; TOMA, H.K.; XAVIER, M.S.; MEIRELLES, M.N.S.L.; ALMOSNY, N.R.P. Expression and antigenican alysis of there combinant TRP36 protein from *Ehrlichia canis* São Paulo strain for serologic tests, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 1-12, 2020.

MEDRONHO, R.A.; BLOCH, V.K.; LUIZ, R.R.; WERNECK, G.L. Epidemiologia. SãoPaulo. Atheneu.2009.

MOORE, A.; NELSON, C.; MOLINS, C.; MEAD, P.; SCHRIEFER, M. Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States. **Emerging Infectious Diseases,** v.22, n. 7, p. 1169–1177, 2016.

MUÑOZ-LEAL, S.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; MESQUITA, E.T.K.C.; MARQUES, E.P. Jr. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rudis* in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 864-871, 2018.

MUPANOMUNDA, M.; WILLIAMS, J.F.; MACKENZIE, C.D.; KAISER, L. *Dirofilaria immitis*: heartworm infection alters pulmonary artery endothelial cell behavior. **Journal of Applied Physiology**, v.82, n.2, p.389-398, 1997.

O'DWYER, L.H.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P.; FLAUSINO, W.; FONSECA, A.H. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi latu sensu* associated with dog ticks in rural areas of the Rio de Janeiro State, **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.201-205, 2004.

OLIVEIRA, L.V.S.; OLIVEIRA, R.R.A.; ALCÂNTARA, E.T.; ÁLVARES, F.B.V.; FEITOSA, T.F.; BRASIL, A.W.L.; VILELA, V.L.R. Hematological, clinical and epidemiological aspects of *Hepatozoon canis* infection by parasitological detection in dogs from the rural area of Sousa, Paraíba, Brazil, **Ciência Rural**, v.51, n. 3, p. 1-8, 2021.

PAULINO, P.G.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PECKLE, M.; COSTA, R.L.; VITARI, G.V.; VILELA, J.A.R.; ABREU, A.P.M.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil, **Preventive Veterinary Medicine,** v. 159, n. 1, p. 135-142, 2018.

CASTRO, V.V.; AYRES, E.C.B.S.; CANEI, D.H.; PEREIRA, M.E.; SOUSA, V.R.F.; CHITARRA, C.S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; ALMEIDA, A.B.P.F. Molecular prevalence and factors associated with *Babesia vogeli* infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil, **Ciência Rural**, v.50, n. 2, p. 1-6, 2020.

PÉREZ-OSORIO, C.E.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J.E.; LÉON, J.J.A.; ZAVALA-CASTRO, J.E. *Rickettsia felis* as Emergent Global Threat for Humans.**Emerging Infectious Diseases**, v.14, n. 7, p.1019-1023, 2008.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for StatisticalComputing,Vienna,2019.Disp<https://www.Rproject.org/.http://webcanine.com/wp content/uploads /2007 /04/risk.pdf > Acesso em 17 mar 2019.

RAWLINGS, C.A. Cardiopulmonary function in the dog with *Dirofilaria immitis*: during infectionandaftertreatment. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, n.3, p.319-325, 1980.

RIBEIRO, C.M.; MATOS, A.C.; AZZOLINI, T.; BONES, E.R.; WASNIESKI, E.A.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; SIMONE, B.; LUCHEIS, S.B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* instray dogs in Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.2, p.129-136, 2017.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2107-212, 1994.

RIKIHISA, Y.Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses and humans. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 250-251, 2000.

RODRIGUES, A.M.A.; VASCONCELOS, S.A.; GONÇALES, A.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; HAGIWARA, M.K. Anticorpos revelados pelo teste de inibição do crescimento de leptospiras *in vitro* (TICL) contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni em cães adultos revacinados anualmente com vacina comercial contendo bacterinas dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.627-634, 2013.

ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V.; GUTIÉRREZ, R.; YASUR-LANDAU, D.; BANETH, G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis in* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection, **Veterinary Parasitology**, v.199, n. 3, p. 121– 128, 2014.

ROTONDANO, T.E.F; ALMEIDA, H.K.A; KRAWCZAK, F.D.S.; SANTANA, V.L.; VIDAL, I.F.; LABRUNA, M.B.; MELO, M.A.D. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de**

Parasitologia Veterinaria, v. 24, n. 1, p. 52-58, 2015.

SANTOS, A.V.P.; SOUZA, A.M.; BUENO, M.G.; CATAO-DIAS, J.L.; TOMA, H.K.; PISSINATI, A.; MOLINA, C.V.; KIERULFF, M.C.M.; SILVA, D.G.F.; ALMOSNY, N.R.P. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* in free-living golden headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 60, n. 11, p. 1-13, 2018.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.; COSTA, R.L.; SANTOS, M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vetores**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.

SALLES, R.S.; FONSECA, A.H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R.C.; YOSHINARI, N.H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi latu sensu* em eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**. v. 22, n. 127, p. 46-49, 2002.

SILVA, S.R.; LOURENÇO, E.C.; TASSINARI, W.S.; FAMADAS, K.M. Estudo descritivo da
série histórica de ocorrência de carrapatos em cães assistidos em duas unidades privadas de saúde animal na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 171-177, 2016.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vetor of *Ehrlichia platys*, **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n. 9, p. 1537 -1541, 1991.

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic Indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v.153, n.1, p.131-138, 2008.

SOARES, C.O.; 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. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.21, n.1, p.111-114, 1999.

SUEPAUL, S.M.; CARRINGTON, C.V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A.A. Study on the efficacy of Leptospira vaccines developed from serovars isolated from Trinidad and comparison with commercial vaccines using a hamster model, **Vaccine**, v.28, n.1, p.5421-5426, 2010.

SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, n.27, p. 1-9, 2013.

TRANCOSO, T.A.L.; LIMA, N.C.; BARBOSA, A.S.; LELES, D.; FONSECA, A.B.M.; LABARTHE, N.V.; BASTOS, O.M.P.; UCHÔA, C.M.A. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ,

Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v.29, n. 1, p. 1-12, 2020.

VIEIRA, T.S.W.J; VIEIRA, R.F.C.; NASCIMENTO, D.A.G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDON, R.S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 104-109, 2013.

VILELA, J.A.R.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; FALQUETO, A.; SANTOS, H.A.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H. Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v. 35, n. 1, p. 63-68, 2013.

VIOL, M.A.; GUERRERO, F.D.; OLIVEIRA, B.C.M.; AQUINO, M.C.C.; LOIOLA, S.H.; MELO, G.D.; GOMES, A.H.S.; KANAMURA, C.T.; GARCIA, M.V.; ANDRENOTTI, R.; LIMA, V.M.F.; BRESCIANI, K.D.S. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, 3479-3484, 2016.

THOMAS, A. D.; NEITZ, W. O. The importance of diseases in wild animals. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 30, p. 419-425, 1933.

YOSHINARI, N.H.; ABRÃO, M.G.; BONOLDI, V.L.M.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Coexistence of Antibodies to Tick-borne Agents of Babesiosis and Lyme Borreliosis in Patients from Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.3, p. 311-318, 2003.

YOSHINARI, N.H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V.L.N.; MARANGONI, R.G.; GAUDITANO, G. Doença de Lyme-símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari: Zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n.3, p. 363-369, 2010.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; YASUDA, P.H.; BAGGIO, D.; STEERE, A.C.; PAGLIARINE, R.C.; COSSERMELLI, W. Estudo epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 47, n. 2, p. 71-75, 1992.

YOSHINARI, N.H.; OYAFUSO, L.K.; MONTEIRO, F.G.V.; BARROS, P.J.L.; CRUZ, F.C.M.; FERREIRA, L.G.E.; BONASSER, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Doença de
Lyme: relato de um caso observado no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,**v. 48, n. 4, p. 170-174, 1993.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.;BONOLDI, V.L.N.; ISHIKAWA, M.; BARROS-BATTESTI, D.M.B.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil, **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111-117, 1997.

CAPÍTULO III

PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E ASSOCIAÇÃO ENTRE SOROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR PARA INTERPRETAÇÃO DIAGNÓSTICA DAS HEMOPARASITOSES TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS EM CÃES

RESUMO

A clínica médica de pequenos animais desempenha um papel importante no diagnóstico, tratamento, controle e profilaxia das principais doenças que afetam os cães. Nesse contexto, as hemoparasitoses representam um complexo de doenças parasitárias mais comuns em cães, sendo considerada endêmica no meio urbano. Apesar dos esforços para combater essas doenças, muitos animais ainda sofrem, uma vez que muitos dos métodos de controle de seus vetores não têm sido eficazes, permitindo que os cães se infectem várias vezes por ano. Os métodos de diagnóstico das hemoparasitoses mais utilizados na clínica são: o exame direto de esfregaço sanguíneo (ES) e os testes sorológicos (ELISA modificado) e com menor frequência os testes de biologia molecular (PCR). O objetivo do estudo foi avaliar o perfil dos cães atendidos na rotina da clínica de pequenos animais e analisar os diferentes testes de diagnóstico para as seguintes hemoparasitoses: erliquiose, anaplasmose e babesiose. Para o diagnóstico, as amostras de 70 cães domiciliados foram coletadas por conveniência de acordo com a ordem de chegada para consulta. Foram realizadas comparações tanto entre animais positivos e negativos nos diferentes testes diante dos principais sinais clínicos apresentados no momento da consulta. Todos os animais incluídos apresentavam pelo menos 3 sinais clínicos e 3 alterações laboratoriais sugestivas de hemoparasitose. As amostras de sangue foram analisadas por esfregaço, sorologia e o PCR. A prevalência de *Ehrlichia* spp foi 34,3% e 37,1%, *Anaplasma* spp. foi 11,4 % e 11,4 % e *Babesia* spp. foi 0,0 e 8,6 % no teste ELISA e PCR respectivamente. O parasitismo geral dos 3 agentes para as 3 técnicas variou entre 1,4 % a 67,1%. Animais com epistaxe foram 100% positivos para *Ehrlichia* spp. no ELISA e 80% na PCR. A associação entre sorologia, PCR, sinais clinicos e hematológicos foi decisivo para identificar e selecionar o perfil dos cães com percentual de animais expostos e doentes 6 vezes maior que o de animais não expostos e sadios permitindo a tomada de decisão para inicio de tratamento.

Palavras-chave: cão, hemoparasito, esfregaço de sangue, ELISA, PCR. Associação de métodos diagnósticos

ABSTRACT

The small animal medical clinic plays no importante role in the diagnosis, treatment, control and prophylaxis of the main diseases that affect dogs. In this context, hemoparasitos is represents a complex of parasitic diseases more common in dogs, being considered endemic in the urban environment. Despite efforts to comba t these diseases, many animals still suffer, since many of the methods of controlling their vectors have not been effective, allowing dogs to become infected several times a year.The diagnostic methods of hemoparasitosis mostusedin the clinic are direct blood smear examination (ES) and serological tests (ELISA) to the detriment of molecular biology tests (PCR). The objective of the study was to analyze the profile of dogs seenin ther out ine of the small animal clinic and to evaluate the accuracy of diferente diagnostic techniques for ehrlichiosis, anaplasmosis and babesiosis. For diagnosis, samples were collected for convenience from 70 dogs domiciled according to the order of arrival for consultation. Comparisons were made between positive and negative animals in the diferentes tsin view of the main signs and symptoms presented at the time of the consultation. All animals included had at least 3 clinical signs and symptoms and 3 laboratory changes suggestive of hemoparasitosis. Bloods amples were analyzed by blood smear, ELISA and PCR.The precision analysis was performed determining the sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and kappa index.The prevalence of Ehrlichia spp was 40%and 37.1%, *Anaplasma* spp. was 34.3% and 14.3% and Babesia spp. was 8.6% and 14.3% in the ELISA and PCR test respectively. The general parasitismo of the 3agents for the 3 techniques ranged from 1.43 % to 67,6%. For the diagnosis of Ehrlichia spp. Animals with epistaxis were 100% positive for Ehrlichia spp. in ELISA and 80% in PCR. The association of clinical, hematological, serological and molecular signs was able to detect and select false positive and negative animals for hemoparasitosis. Our results were only possible with the association of clinical and laboratory data and the use of different methods for the definitive diagnosis of *Ehrlichia* spp. *Anaplasma* spp. and Babesia spp. Real- time PCR was considered the complementary technique for the diagnosis of *Ehrlichia* spp. *Anaplasma* spp. and Babesia spp.

Keywords: dog, hemoparasite, bloodsmear, ELISA, PCR.

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos desde a primeira visualização de formas infectantes no sangue por Babés em1888, Starcovicci em 1893, Piana & Galli-Valerio em 1895 e Donaten & Lestoquard em 1935 era baseado no exame direto de esfregaço sanguíneo para visualização de formas infectantes (THOMAS & NEITZ, 1933; BRION, 1943; ALMOSNY, 2002). Com o passar dos anos, os métodos de diagnóstico evoluíram e a necessidade de um diagnóstico preciso e confiável permitiu o surgimento de novas técnicas no meio acadêmico-científico que chegaram na rotina das clínicas veterinárias de pequenos animais. (RAMOS et al., 2009; LABARTHE et al., 2014; TRANCOSO et al., 2020)

Na rotina clínica, as principais hemoparasitoses comumente diagnosticadas em cães são: erliquiose, anaplasmose, babesiose, hepatozoonose e dirofilariose. O seu diagnóstico é baseado nos sinais clínicos, exames direto de esfregaço sanguineo e sorológicos são os mais utilizados, visto o custo benefício e também a rapidez para o resultado. No entanto em virtude das semelhanças com os sinais clínicos apresentados em outras enfermidades (RIKIHISA et al., 2000) ou os mesmos para o complexo chamado “doença do carrapato” pelos responsáveis dos animais e as reações sorológicas cruzadas entre as diferentes espécies relacionadas (RIKIHISA et al., 1997), fizeram com que esses métodos tenham suas sensibilidades e especificidades comprometidas (RAMOS et al., 2009; FONSECA et al., 2017; TRANCOSO et al., 2020).

Com advento da biologia molecular e a reorganização das bactérias da tribo Rickettsilales dentro da família Anaplasmataceae, foi verificado a importância do diagnóstico específico das principais bactérias desta familia que acometem os animais domésticos, silvestres e seres humanos. (DUMLER et al., 2001), sendo a biologia molecular uma ferramenta de diagnóstico direto complementar em associação com teste sorológico para chegar a um diagnóstico definitivo (DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2009).

Apesar da evolução no diagnóstico das hemoparasitoses com a utilização das ferramentas moleculares, muitas clínicas veterinárias ainda não as utilizam, sendo que os testes sorológicos rápidos com dupla lavagem ou imunocromatográficos, oferecem um diagnóstico rápido, permitindo seu uso na rotina clínica devido ao custo-benefício, além de identificar doença subclínicas (MYLONAKIS et al., 2003; FONSECA et al., 2017).

Considerando as diferenças demonstradas anteriormente entre os isolados recentes de *E. canis* de diversas regiões (AGUIAR et al., 2016), é fundamental para analisar novos testes de diagnóstico em cães naturalmente ou experimentalmente infectados o estudo por exemplo da proteína recombinante TRP36 principalmente. Experimentos para desenvolver um teste

dot-ELISA usando esta proteína como o antígeno é a próxima etapa para produzir um diagnóstico rápido, confiável, acessível e útil ferramenta para erliquiose no Brasil. (MEDEIROS et al., 2020)

O objetivo do estudo neste capítulo, foi analisar o perfil clinico-laboratorial dos cães expostos as principais hemoparasitoses transmitidas por carrapatos no ambiente urbano, através da associação de dois testes de diagnóstico: sorologia e biologia molecular além de verificar o perfil de cada animal diante das alterações clínicas, laboratoriais e os resultados dos testes de diagnóstico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área do estudo

Foram utilizadas amostras provenientes de duas clínicas veterinárias particulares localizadas em área surbanas da Região Metropolitana do Rio de Janeiro; a descrição das áreas se encontra na Tabela 1.

Tabela1. Descrição demográfica e coordenadas geográficas dos locais do estudo.

DESCRIÇÃO	CLÍNICA A	CLÍNICA B
Localidade	Bangu	São João de Meriti
Áreatotal	45,7 km²	34,8 km²
População total	243.125 habitantes (hab)	472.906 habitantes (hab)
Densidade	5.320hab / km²	13.574 hab / km²
IDH	0,794	0,719
Altitude mínima	12 m	19 m
Altitude máxima	1.014 m	162 m
Coordenadasgeográficas	22° 52′ 31"Latitude S 43° 27′ 55"Longitude O	22° 48′ 14"Latitude S 43° 22′ 20"Longitude O

Fonte: IBGE – Censo Demográfico, 2010.

2.2 Amostragem

Para o tamanho da amostra foi definida uma prevalência esperada de 4% baseado no trabalho realizado em clínica veterinária de pequenos animais, como mesmo perfil das clínicas veterinárias do nosso estudo no Rio de Janeiro (VILELA et al., 2013). Admitiu-se um intervalo de confiança de 95 % e margem de erro de 5%. O cálculo amostral foi realizado conforme a fórmula descrita por Sampaio (2002): n = (1,96) ² x *P*esp (1- *P*esp) /d², onde: n =

tamanho da amostra; *P*esp = prevalência esperada; d² = precisão absoluta desejada. Após utilização da fórmula e cálculo da amostra, foi estabelecido o número mínimo de 70 amostras.

As amostras foram selecionadas por conveniência de acordo com a rotina de atendimentos das clínicas veterinárias. Foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aos responsáveis técnicos (RT) das clínicas veterinárias e dos responsáveis legais pelos animais assim que os mesmos eram detectados tendo perfil para participar do estudo. Logo em seguida os animais selecionados foram submetidos aos exames clínicos, laboratoriais e amostras de sangue foram coletadas. O número total de amostras coletadas foi de 70 amostras, 29 amostras da Clínica A e 41 da Clínica B no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2019.

2.3 Coleta dos dados clínicos e laboratoriais nos prontuários

Para a coleta e tabulação dos dados, utilizamos planilha de Excel Microsoft Windows 8, em que somente os dados clínicos e laboratoriais dos animais foram coletados mediante liberação e indicação do médico veterinário responsável pelo animal selecionado para o estudo. Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados somente quando o número do prontuário era disponibilizado para acesso do pesquisador, mantendo-se desta forma a confidencialidade. Para a investigação foram coletados dados como: gênero do animal (macho ou fêmea), faixa etária (< 1 ano e > 1 ano), distúrbios gastrointestinais (vômito, hematêmese, hematoquezia, diarreia), distúrbios hematológicos (anemia, trombocitopenia, linfopenia, leucopenia, neutropenia, mucosas hipocoradas, epistaxe, petéquias, equimoses e sulfusões), distúrbios ortopédicos (artralgia, mialgia, claudicação e derrame articular), distúrbios neurológicos (convulsão, síndrome vestibular e nistagmo), distúrbios viscerais (esplenomegalia, hepatomegalia, linfonodomegalia visceral e / ou apendicular, icterícia, ascite e insuficiência renal), distúrbios oftálmicos (hifema, episclerite, blefarite, úlcera de córnea, opacidade de cristalino e/ ou catarata), distúrbios respiratórios (tosse improdutiva ou seca, pneumonia intersticial e rinite purulenta ou serosa), coinfecções e outros achados clínicos, laboratoriais e de imagem (anorexia, febre, caquexia, piometra, cinomose, pancreatite, leptospirose, parvovirose, tumor venéreo transmissível (T.V.T.), presença ou histórico de carrapatos e uso de endectocida de uso oral).Como critérios de inclusão/ exclusões para o estudo foram selecionados segundo critérios na Tabela 2 :

Tabela **2.** Critérios de inclusão / exclusão para os cães suspeitos de hemoparasitoses

Critérios	Inclusão	Exclusão
Idade	> 1 ano	< 1 ano e > 10 anos
Tratamento	Remoto > 2 anos	Recente < 1 ano
Diagnóstico positivo	1 ano < x < 10 anos	< 6 meses
Exames minimos	Hemograma, Sorologia e PCR	Ausência de um deles
Uso de Corticóide	Remoto > 1 ano	Recente < 1 ano
Uso de quimioterápico	Não	Sim
Uso de Carrapaticida	Sim	Não
Sinais clinicos	Minimo de 3 sinais	Ausência de sinais
Assinatura de TCLE	Sim	Não
Infestação / Histórico de carrapatos	Sim	Não
Doenças e coinfecções	Não	Sim

2.4 Coleta das amostras sanguíneas

Uma amostra de no mínimo 3 ml de sangue periférico foi coletada de cada animal uma única vez, através de punção da veia cefálica, ou quando acesso era difícil, devido ao estado grave inerente a clínica do animal, era feito acesso via jugular externa. A coleta de amostra dos animais foi feita somente pelo médico veterinário para evitar alterações como: aumento no tempo de coleta, hemólise extravascular e formação de micro coágulos que prejudicariam análises futuras principalmente como: hematologia clínica, sorologia e biologia molecular. Após coleta, as amostras foram colocadas em tubo estéril com anticoagulante EDTA, sendo devidamente identificadas com código composto por letra e número na sequência (S1 – S70) acondicionadas em recipiente térmico e posteriormente encaminhadas para diferentes laboratórios.

Para distribuir a amostra para destinos diferentes, em tubo sem anticoagulante devidamente identificado com a mesma sequência, foi transferida uma alíquota de 1 ml e acondicionada em recipiente térmico e foi imediatamente encaminhada para o Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública para o laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) para

realização das metodologias moleculares. Outra alíquota com volume de 1 ml foi retirada da primeira amostra e acondicionada em tubo sem anticoagulante para a execução do kit de teste comercial (Snap 4Dx Plus ®, IDEXX Laboratories, Maine, EUA). A última alíquota de 1ml permaneceu no tubo de origem e foi encaminhada para o laboratório particular de referência em Patologia Clínica Veterinária na região da Zona Oeste do Rio de Janeiro para a execução do hemograma completo, hematoscopia e pesquisa de hemoparasitos em esfregaço sanguíneo (ES), com capa leucocitária somente quando solicitado pelo veterinário. Os resultados de referência foram com base em Kaneko et al. (2008).

Na rotina da clínica veterinária foram realizados os testes de diagnóstico sorológicos para associação, utilizando o kit de teste comercial (Snap 4Dx Plus ®, IDEXX Laboratories, Maine, EUA; ref. 9926193; lote DP844; validade 02/2019) e para fechar e complementar o diagnóstico de hemoparasitoses.

As técnicas de diagnóstico utilizadas nesse estudo foram: Exame direto de esfregaço sanguíneo (ES), para detecção de mórulas de agentes da família Anaplasmataceae que na rotina de clínicas veterinárias são mais frequentes *E. canis* e *A. platys* que são riquétsias intracelulares obrigatórias, tendo a primeiro tropismo por monócitos e neutrófilos e, a segunda, por plaquetas (RIKIHISA, 2000).

O (ES) também é utilizado para detecção de trofozoítos piriformes ou ameboides de agentes da família Babesiidae que reúnem protozoários com tropismo por eritrócitos, representados com maior frequência por *Babesia* spp. (RIBEIRO et al., 2017). Não foram realizados (ES) de ponta deorelha ou plexo ungueal para diagnóstico direto na clínica, devido na rotina de clínica médica a demanda no atendimento não permitir a execução desta técnica, além da habilida em realizá-la não ser realidade entre os médicos veterinários clínicos. Para o teste de sorológico foi realizado o *dot* ELISA para o diagnóstico de IgM de *Babesia* spp. e o Snap 4Dx Plus® para o diagnóstico sorológico de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

2.5. Procedimentos Laboratoriais

2.5.1 Esfregaço Sanguíneo (ES)

Os exames foram obtidos através de resultados disponibilizados através do hemograma completo com pesquisa de hemoparasitos sem capa leucocitária, devido a demanda pelo baixo custo, esta técnica não foi muito solicitada. Desta forma vamos considerar pesquisa de hemoparasitos sem capa leucocitária que foi a maior frequência de resultados encontrados nos hemogramas analisados. Para cada amostra foi feita um esfregaço sanguíneo e fixado com álcool metílico puro. Em seguida foram corados pelo método de Giemsa (1:10) por 45 minutos

em temperatura ambiente. Os esfregaços foram examinados em microscópio óptico em objetiva de imersão feita para análise por médico veterinário Patologista com especialização em patologia clínica, para leitura de todas lâminas, com ênfase na franja onde encontramos a mioria das formas parasitárias de membros Anaplasmataceae e Babesiidae.

2.5.2 Kit SNAP 4Dx Plus ® e Dot ELISA IgM Babesia spp

Os testes foram realizados com a alíquota de 1ml que permaneceu na clínica veterinária, antes do envio das amostras para confecção dos hemogramas. Algumas amostras, devido ao não consentimento dos responsáveis pelos animais, ficaram sem a realização dos demais testes, logo estas amostras foram descartadas. O diagnóstico sorológico foi feito por meio do kit de teste comercial ELISA (Snap 4Dx Plus ®, IDEXX Laboratories, Maine, EUA; ref. 9926193; lote DP844; validade 02/2019), seguindo as recomendações do fabricante.

2.5.3 PCR em tempo real (qPCR)

2.5.3.1 Extração do DNA total das amostras sanguíneas

Para extração do DNA total foi utilizado 300 µL de cada amostra de sangue, utilizando o kit comercial DNeasy Tissue (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante que foram diluidas em 100 µL da solução de reidratação que acompanha o kit. Após a obtenção do DNA, as amostras foram preservadas sem freezer -80 ºC até o momento das análises.

2.5.3.2 PCR em tempo real (qPCR) para *Anaplasma platys*

A metodologia seguiu o que foi preconizado por Silva et al. (2016), onde nas reações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores, gltA 84F (5'-GACCTACGATCCGGGATTCA-3`) e gltA 84R (5`-TGGCGCAGTATACCCTTTTCTC-3'), e a sonda PLATYsp (5'-FAM-TCTACCGCGGCATGCAGCTCTG-TAMRA-3').

As reações foram realizadas em duplicata no aparelho Step One Plus TMReal-TimePCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20 µL, contendo: 1X de Universal PCR Master Mix 18 (Applied Biosystems), 600 nM de cada oligoiniciador, 250 nM da Sonda e 3µL do DNA (300 ng).

2.5.3.3 PCR em tempo real (qPCR) para *Babesia vogeli*

As amostras foram testadas por qPCR com base no gene *hsp70* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores, BvqF (5'-GCTGGTGACACCCACCTT-3') e BvqR (5'-CAACAAGCGTGCCCTCC-3') e a sonda de hidrólise Bvq (5'-NED-CCTCCTCGTTGAGCACT- MGB-3') como descrito por Paulino et al. (2018a).

As reações foram realizadas em um volume final de 12 µL no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems ®, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA), contendo: 1X TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x), 800 nM de cada iniciador, 250 nM de Sonda e 300 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em duplicata. As amostras com amplificação inferior a 40 valores de ciclos de quantificação (Cq) foram consideradas positivas.

2.5.3.4 PCR em tempo real (qPCR) para *Ehrlichia canis*

Foram utilizados os primers: (5'TATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTGTTA'3; R5'ACCATTTCTAATGGCTATTCCGTACTA'3) que amplificou um fragmento de 93 pb do gene de *E. canis* 16S rRNA de cópia única, que foi ainda verificado usando a sonda 5'6 FAM-TGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGG-TAMRA-3', como descrito por Paulino et al. (2018b).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20µ l, utilizando-se a mistura disponível comercialmente (Biogen.com, Kimbolton Cambs, Reino Unido) com as condições de reação universais determinado pelo fabricante. Premier e sondas foram utilizadas nas concentrações foram de 500 e 250 nM, respectivamente. O perfil de amplificação foi o seguinte: 2 min a 50,8 ºC, 10 min a 95,8º C, seguido por 45 ciclos a 95,8º C e 1 min a 60º C.

2.6 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos valores de prevalência das hemoparasitoses dos cães pelos diferentes hemoparasitos mais comuns na clínica veterinária pelos diferentes métodos de diagnóstico (Sorologia) e (qPCR) sendo excluido para análise o (ES) devido baixa prevalência e consequentemente a não observância de associação. Posteriormente foi realizada associação entre as técnicas de sorologia e qPCR diante dos diferentes sinais clínicos comuns na clínica veterinária manifestados através de distúrbios em vários sistemas fisiológicos que representam aspectos clinicos relevantes para o diagnóstico presuntivo em casos de ausência ou

falha nas metodologias de diagnósticos empregadas na clínica.Foi feita uma avaliação da ocorrência de hemoparasitoses e da prevalência de positivida de para cada hemoparasito e para cada técnica. Para avaliação dos testes diagnósticos, foi utilizado o teste de diferença entre proporções (AGRESTI, 2012) sendo utilizado para verificar se houve diferença estatística entre a combinação dos testes diagnósticos. Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico R versão 3.6 (R CORE TEAM, 2019).

2.7 Aprovação do Comitê de Bioética

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o processo de número CEUA / 711328081 – 8 (Anexo 1).

3 RESULTADOS

A prevalência de hemoparasitos de cães utilizando o exame direto de esfregaço sanguíneo (ES) para pesquisa de mórulas de agentes da família Anaplasmataceae, foi de 0% (0/70) tanto para Ehrichia spp. como Anaplasma spp., enquanto para os trofozoítos ameboides ou piriformes de Babesia spp. foi 1,43% (1/70). Em relação à análise dos testes sorológicos para os principais hemoparasitos mais estudados nas clínicas veterinárias, a pesquisa de IgM/IgG de *Ehrlichia* spp. foi de 34,3% (24/70), para a pesquisa de IgM/IgG de *Anaplasma* spp.obtemos a soroprevalência de 11,4% (8/70), a pesquisa de IgM (dot-ELISA) de *Babesia* spp. apresentou uma soroprevalência de 8,6% (6/70) à confirmar. Entretanto, com o uso da biologia molecular, utilizando a qPCR Multiplex, a prevalência de *Ehrlichia* spp. foi de 37,10% (26/70), A. *platys*. 11,4 % (8/70) e *Babesia* spp foi de 8,6 % (6/70). (Tabela 3).

Tabela 3. Prevalência das principais hemoparasitoses e coinfecções estudadas nas clínicas veterinárias e seus respectivos testes de diagnóstico ES, Snap 4Dx Plus® e *q*PCR Multiplex utilizando amostras de sangue de 70 cães.

Agente Etiológico	**ES % (n/N)**	**Snap 4Dx Plus % (n/N)**	***q*PCR Multiplex % (n/N)**
***Ehrlichia* spp.**	0,0 (0/70)	34,3 (24/70)	37,1 (26/70)
Anaplasma platys	0,0 (0/70)	11,4 (8/70)	11,4 (8/70)
***Babesia* spp.**	1,4 (1/70)	*	8,6 (6/70)
Coinfecções			
Ehrlichia spp.* + *Anaplasma platys	0,0 (0/70)	15,7 (11/70)	2,9 (2/70)
Ehrlichia spp.* + *Babesia spp.	0,0 (0/70)	0,0 (0/70)	4,3 (3/70)
Anaplasma platys* + *Babesia spp.	0,0 (0/70)	0,0 (0/70)	1,4 (1/70)
Total % (n/N)	1,4 (1/70)	61,4 (43/70)	65,7 (46/70)

(%) – percentual de positivos; (n) – amostras positivas; (N) –Total de amostras.

As amostras foram submetidas a dois métodos de diagnóstico sugeridos e a associação das razões de proporção entre os métodos foram analisados. O método de diagnóstico (ES) foi demonstrado apenas como descritivo para evidenciar sua baixa sensibilidade e o porquê foi uma das razões de sua exclusão para utilização na rotina da clínica e da pesquisa (RAMOS et al., 2009).

Para o diagnóstico de *Ehrlichia* spp. a associação entre as técnicas de diagnóstico que não apresentou uma diferença acentuada foi entre sorologia e *q*PCR. Na associação das técnicas para o diagnóstico de *Anaplasma* spp. também não houve variabilidade entre as prevalências. Entretanto para *Babesia* spp. a variabilidade da prevalência foi mais sutil. De forma geral a diferença de prevalência mais expressiva se encontra na técnica ES em relação as demais, ELISA e PCR.

Dentre os sinais clínicos supracitados na Tabela 4, distribuídos em diferentes distúrbios sistêmicos, algumas considerações se fazem necessárias. Nos distúrbios gastrointestinais, apenas aqueles que não estão comumente relacionados com a suspeita de

hemoparasitoses apresentaram uma grande diferença no teste de ELISA, enquanto no teste de PCR, nenhum destes sintomas apresentaram diferenças relevantes. Nos distúrbios hematológicos a ocorrência foi o inverso, com exceção de duas alterações dentro do hemograma como: linfopenia e neutropenia além de alterações de origem cutânea como petéquias, equimoses e sufusões, todas no teste ELISA. Entretanto no método de PCR, somente um distúrbio dentro do hemograma, a leucopenia, e um de origem cutânea apresentaram diferença importante nesta técnica de diagnóstico. No decorrer da tabela os distúrbios ortopédicos, neurológicos, viscerais, oftálmicos e respiratórios, não apresentaram grandes diferenças em ambos os testes. Em relação aos resultados de coinfecções e outros achados, somente 3 apresentaram uma certa diferença; presença de carrapato no teste sorológico e na PCR, a anorexia somente na PCR e a febre somente no sorológico.

Tabela 4. Comparação entre os resultados de teste de diagnósticos sorológico e molecular diante dos sinais clínicos e algumas comorbidades entre os 70 cães com suspeitas e diagnóstico de positivo para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp.

SINAIS CLÍNICOS	N	*ELISA(+) n (%)	ELISA(-) n (%)	(*p-valor*)	*PCR (+) n(%)	PCR(-) n (%)	(*p-valor*)
Distúrbios gastrointestinais							
Vômitos sem sangue	19	13 (68,4)	6 (31,6)	**(<0,05)***	9 (47,4)	10 (52,6)	(1,00)
Hematoquezia	16	11 (68,7)	5 (31,2)	(0,08)	9 (56,3)	7 (43,7)	(0,74)
Hematêmese	5	3 (60,0)	2 (40,0)	(1,00)	4 (80,0)	1 (20,0)	(0,21)
Diarreia sem sangue	4	4 (100,0)	0 (0,0)	**(<0,05)***	2 (50,0)	2 (50,0)	(1,00)
Distúrbios hematológicos							
Trombocitopenia	42	35 (83,3)	7 (16,7)	**(<0,05)***	25 (59,5)	17 (40,5)	(0,13)
Anemia	31	21 (67,7)	10 (32,3)	**(<0,05)***	19 (61,3)	12 (38,7)	(0,13)
Linfopenia	22	14 (63,6)	8 (36,4)	(0,13)	13 (59,1)	9 (40,9)	(0,37)
Leucopenia	15	11 (73,3)	4 (26,7)	**(<0,05)***	13 (86,7)	2 (13,3)	**(<0,05)***
Mucosas hipocoradas	13	10 (76,9)	3 (23,1)	**(<0,05)***	7 (53,8)	6 (46,2)	(1,00)
Epistaxe	10	10 (100,0)	0 (0,0)	**(<0,05)***	8 (80,0)	2(20,0)	**(<0,05)***
Neutropenia	5	3 (60,0)	2 (40,0)	(1,00)	4 (80,0)	1 (20,0)	(0,21)
Equimoses	3	2 (66,7)	1 (33,3)	(1,00)	3 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Sufusões	2	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)	2 (100,0)	0 (0,0)	(0,32)
Petequias	2	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)	2 (100,0)	0 (0,0)	(0,32)
Distúrbios ortopédicos							
Artralgia	9	6 (66,7)	3 (33,3)	(0,35)	4 (44,4)	5 (55,6)	(1,00)
Mialgia	8	5 (62,5)	3 (37,5)	(0,62)	4 (50,0)	4 (50,0)	(1,00)
Claudicação	8	6 (75,0)	2 (25,0)	(0,13)	5 (62,5)	3 (37,5)	(0.62)
Edema articular	3	2 (66,7)	1 (33,3)	(1,00)	2 (66,7)	1 (33,3)	(1,00)
Distúrbios neurológicos							
Convulsão	9	7 (77,8)	2 (22,2)	(0,06)	5 (55,6)	4 (44,4)	(1,00)
Síndrome vestibular	1	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Nistagmo	1	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Distúrbios víscerais							
Esplenomegalia	11	7 (63,3)	4 (36,4)	(0,39)	6 (54,5)	5 (45,5)	(1,00)
Insuficiência renal	11	6 (54,5)	5 (45,5)	(1,00)	5 (45,5)	6 (54,5)	(1,00)
Hepatomegalia	6	3 (50,0)	3 (50,0)	(1,00)	4 (66,7)	2 (33,3)	(0.56)
Linfonodomegalia	6	2 (33,3)	4 (66,7)	(0.56)	4 (66,7)	2 (33,3)	(0.56)
Icterícia	3	2 (66,7)	1 (33,3)	(1,00)	2 (66,7)	1 (33,3)	(1,00)
Ascite	1	0 (0,0)	1 (100,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Distúrbios oftálmicos							
Hifema	2	2 (100,0)	0 (0,0)	(0.32)	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)
Ulcera de córnea	1	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Catarata	1	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Distúrbios respiratórios							
Tosse seca	3	1 (33,3)	2 (66,7)	(1,00)	1 (33,3)	2 (66,7)	(1,00)
Pneumonia intersticial	2	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)
Rinite purulenta	1	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Coinfecções e outras							
Carrapatos	17	12 (70,6)	5 (29,4)	**(<0,05)***	13 (76,5)	4 (23,5)	**(<0,05)***
Anorexia	17	11 (64,7)	6 (35,3)	(0.17)	14 (82,3)	3 (17,6)	**(<0,05)***
Febre	16	12 (75,0)	4 (25,0)	**(<0,05)***	9 (56,2)	7 (43,7)	(0.72)
Uso de endectocida	12	7 (58,3)	5 (41,7)	(0.68)	8 (66,7)	4 (33,3)	(0.22)
Caquexia	12	8 (66,7)	4 (33,3)	(0,22)	8 (66,7)	4 (33,3)	(0.22)
Piometra	7	5 (71,4)	2 (28,6)	(0,28)	3 (42,9)	4 (33,3)	(1,00)
Cinomose	3	2 (66,7)	1 (33,3)	(1,00)	3 (100,0)	0 (0,0)	(0.10)
Pancreatite	2	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)	1 (50,0)	1 (50,0)	(1,00)

T.V.T.	1	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Leptospirose	1	0 (0,0)	1 (100,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)
Parvovirose	1	0 (0,0)	1 (100,0)	(1,00)	1 (100,0)	0 (0,0)	(1,00)

*Os resultados (+) são para hemoparasitose no geral e não para uma hemoparasitose especifica.

A Tabela 5, apresenta 4 grupos de animais que representam o perfil dos cães suspeitos para pelo menos um hemoparasito com um ente encontrado na rotina das clínicas veterinárias do Rio de Janeiro. Os grupos foram formados a partir dos resultados de sorologia e PCR. O primeiro grupo "A", apresenta animais que receberam resultado do teste sorológico negativo e foi considerado livre de patógenos antes do resultado da PCR, sendo denominado de Falso Negativo (FN). O grupo "B", compreende animais que receberam o mesmo resultado sorológico no grupo "A", mas com resultado de PCR negativo, sendo denominado Verdadeiro Negativo (VN). No grupo "C" os animais receberam resultado sorológico e PCR positivos, sendo chamado de Verdadeiro Positivo (VP). O último grupo "D", os animais receberam o diagnóstico sorológico positivo, porém foi considerado infectado com patógeno, antes do resultado da PCR que foi negativo, sendo denominado Falso Positivo (FP).

Na Tabela 6, encontramos a comparação entre os percentuais dos 4 grupos de animais que representam o perfil dos animais em estudo e a representação do (*p-valor*) para cada associação. Foram realizadas seis associações e a (s) razão (ões) de proporções para verificar diferença significativa entre os grupos. As associações que apresentaram diferença foram aquelas entre os grupos "B" e "C" e os grupos "B" e "D", ou seja, a razão entre os animais (VN) x (VP) e (VN) x (FP) respectivamente. As outras associações entre os grupos não apresentaram diferença significativa porque, além de apresentarem um número de animais bem próximo ao grupo comparado, outras características inerentes aos cães que serão discutidas a seguir, foram responsáveis por nos apresentar este resultado.

Tabela 5. Perfil dos cães que realizaramos métodos de diagnóstico Sorologia ePCR.

Sorologia (-) e PCR (+) **n/N (%)** A = 18 / 70 (25,7)	Os cães que apresentaram resultado (-) na Sorologia e (+) na PCR ainda não possuem anticorpos circulantes com titulação suficiente para sensibilizar o teste diagnóstico, sendo considerado = **Resultado Falso Negativo** realizando somente a Sorologia**.**
Sorologia (-) e PCR (-) **n/N (%)** B = 9 / 70 (12,9)	Os cães que apresentaram resultado (-) na Sorologia e (-) na PCR não possuem anticorpos circulantes nem DNA do agente infeccioso capaz de sensibilizarem o teste de diagnóstico, sendo considerado = **Resultado Verdadeiro Negativo. (**Precisa realizar PCR de medula)
Sorologia (+) e PCR (+) **n/N (%)** C = 22 / 70 (31,4)	Os cães que apresentaram resultado (+) na Sorologia e (+) na PCR significa presença de anticorpos circulantes e DNA do agente infeccioso capaz de sensibilizar os testes de diagnóstico, sendo considerado = **Resultado Verdadeiro Positivo.**
Sorologia (+) e PCR (-) **n/N (%)** D = 21 / 70 (30,0)	Os cães que apresentaram resultado (+) na Sorologia e (-) na PCR significa presença de anticorpos circulantes e ausência de DNA do agente infeccioso capaz de sensibilizarem os testes diagnóstico, sendo = **Resultado Falso Positivo. (**Precisa realizar PCR de medula)

(n) –animaispositivos;(N) –Totaldeamostras;(%)–percentualdepositivos.

Tabela 6. Comparação entre os 4 grupos de animais (A, B, C e D) que realizaram os métodos de diagnóstico ELISA e PCR. Número de animais positivos (n) e seus respectivos percentuais (%).

Sorologia (-) e PCR (+) A = n (%)	x	**Sorologia (-) e PCR (-) B = n (%)**	**(*p-valor*)**
18 (25,7)		9 (12,9)	(0.0866)
Sorologia (-) e PCR (+) A = n (%)	x	**Sorologia (+) e PCR (+) C = n (%)**	
18 (25,7)		22 (31,4)	(0.5746)
Sorologia (-) e PCR (+) A = n (%)	x	**Sorologia (+) e PCR (-) D = n (%)**	
18 (25,7)		21 (30,0)	(0,7061)
Sorologia (-) e PCR (-) B = n (%)	x	**Sorologia (+) e PCR (+) C = n (%)**	
9 (12,9)		22 (31,4)	**(<0,05)***
Sorologia (-) e PCR (-) B = n (%)	x	**Sorologia (+) e PCR (-) D = n (%)**	
9 (12,9)		21 (30,0)	**(<0,05)***
Sorologia (+) e PCR (+) C = n (%)	x	**Sorologia (+) e PCR (-) D = n (%)**	
22 (31,4)		21 (30,0)	(1,0000)

(*) Diferença significativa ao nível de 5% de significância (*p-valor < 0,05*).

Na figura 1, encontra-se animais com um quadro clínico de intensa anemia, epistaxe, apatia, anorexia, pirexia com indicativo de transfusão sanguínea que foram diagnosticados positivos para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. utilizando o kit de teste comercial tipo ELISA (SNAP 4Dx PLUS®), seguindo as recomendações do fabricante.



Figura 1 – Animais com diagnóstico sorológico (SNAP 4DxPlus) de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.:A) Animal com quadro clínico de intensa anemia, epistaxe, apatia, anorexia, pirexia com indicativo de transfusão sanguínea; B) Animal após uma semana em tratamento com doxiciclina; C) Animal com anemia, epistaxe e hematemese intensas, apatia, anorexia e prostração; D)Após a contenção da epistaxe com terapêutica anti-hemorrágica, compressa de gelo, além de tranquilização para baixar fluxo sanguíneo.

4 DISCUSSÃO

A prevalência de hemoparasitos encontrada apresentou diferenças de acordo com o método utilizado, assim como o agente estudado. Ao analisarmos a técnica de ES para o gênero *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., foi encontrada a mesma prevalência 0,0% (0/70), visto que por ser um exame pouco sensível (MYLONAKIS et al., 2003), limitado no diagnóstico específico (RAMOS et a., 2009, DAGNONE et al., 2009), havendo muitos casos de falso positivo devido artefatos que confundem o observador (ALMOSNY, 1998; CORREA et al. 2011). Quando positivo, esse diagnóstico é possível somente a nível de família Anaplasmataceae. Este método de diagnóstico não é mais utilizado na prática e tem sido desencorajado pelos pesquisadores (MYLONAKIS et al., 2003) visto que além de baixa sensibilidade de detecção devido à baixa parasitemia, o resultado negativo sugere fase subclínica ou crônica da doença (BASSI et al. 2011).

No passado, erliquiose e anaplasmose eram prevalentes em diversas regiões do Brasil, tendo seu diagnóstico baseado em sinais clínicos, alterações hematológicas e no exame microscópico do sangue periférico através do ES com prevalências que variavam de 3,3 % a 16% (SOARES et al. 2006; ALBERNAZ et al. 2007; MENESES et al. 2008; NAKAGHI et al .2008; CARLOS et al. 2011; LEAL et al. 2015; ROTONDANO et al. 2015). Nossos resultados foram abaixo do que encontramos na literatura, possivelmente por algumas mudanças na rotina de exames nas clínicas veterinárias. Atualmente muitos laboratórios não executam o método do esfregaço com capa leucocitária (CL) somente um número reduzido de profissionais solicitam este método, que apesar de pouco sensível em comparação aos outros, já foi encontrado prevalência significativa de 66% em comparação com esfregaço de sangue periférico 8%. (MYLONAKIS et al., 2003).

A rotina da clinica veterinária mudou e com o passar dos anos houve mudança no padrão de diagnóstico, visto que, em decorrência do animal ser conduzida a clínica veterinária para consulta somente com enfoque curativo e não preventivo (SILVA et al., 2016) e associado a este fato o exame sorológico é mais utilizado e sobressai em relação aos outros métodos de diagnóstico, com pequena (CARLOS et al., 2011) ou com muita diferença em relação ao método de biologia molecular (RONTODANO et. al., 2015; BAHIENSE et al., 2020). Uma outra justificativa para a baixa sensibilidade que encontramos do método de ES reside no fato de que animais infectados e que passaram pela fase aguda, apresentam cura espontânea, entram na fase subclínica e quando apresentam sinais clínicos já se encontram na fase crônica (ALMOSNY et al., 2002; FONSECA et al., 2017).

Ao chegar a fase crônica, alguns animais com muita frequência já estão com idade avançada sem melhora clínica e neste momento vão a clínica veterinária e recebem o diagnóstico sorológico de erlichiose, sendo este o mais comum e com maior frequência 34,3 % (Tabela3). Além disso, outros diagnósticos são feitos após a este, agravando o caso clínico dos animais devido inúmeras coinfecções que precisam ser tratadas concomitante ao diagnóstico de erlichiose principalmente. Devido inúmeras alterações sistêmicas, seja qual for a fase da erlichiose que animal se encontra, haverá desenvolvimento de doenças glomerulares que vão culminar em insuficiência renal terminal tanto em humanos (VIERA-NETO et al., 2006) quanto em animais (HEIENE et al., 2007). Diante deste fato, um diagnóstico rápido, precoce e específico se faz necessário além da prevenção e controle das enfermidades transmitidas por vetores.

Para o diagnóstico de piroplasmídeos, conhecidos como protozoários do gênero *Babesia vogeli* mais comum em nossa região (VILELA et al., 2013; FONSECA et al., 2017) encontramos o mesmo perfil de diagnóstico utilizando o ES apresentando baixos valores de prevalência devido à baixa sensibilidade desse teste. Nosso estudo a prevalência de *Babesia* spp. foi de 1,43 % (1/70) semelhante e abaixo como em alguns estudos no Brasil (O'DWYER et al., 2009; ROTONDANO et al., 2015; SILVA et al., 2014; LEMOS et al., 2012). Atualmente poucos laboratórios de referência no Rio de Janeiro emitem laudos pelo método de ES com diagnóstico de trofozoíto de *Babesia* spp. Um dos motivos é porque o protozoário *Rangelia vitalii* é morfologicamente idêntica ao piroplasma *Babesia vogeli*, que também causa infecções em cães. Portanto, fazendo um diagnóstico morfológico para diferenciação de espécies não é viável sem o uso da biologia molecular (LEMOS et al., 2017).

O primeiro diagnóstico sugestivo neste caso, devido sua maior prevalência em uma clínica veterinária é o de ehrlichiose. Caso a terapêutica instituída, baseada em um diagnóstico presuntivo para *Ehrlichia* spp. que foi negativo em ES e na sorologia e não apresente melhora clínica, continuando com sinais clínicos sugestivos de doença parasitária, o diagnóstico sorológico é sugerido com o dot-ELISA para pesquisa de IgM de *Babesia* spp, justificando desta forma nossos achados de 8,60% (6/70). Esse valor foi inferior aos trabalhos realizados em MinasGerais que variou entre 51-73,3% (OLIVEIRA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2009; SANTOS et al., 2012) em São Paulo de 50-72% (OLIVEIRA et al., 2008; FURUTA et al., 2009; PAULAN et al., 2013) e no Paraná de 32,90-60,30% (VIEIRA et al., 2013).
Entretanto essas variações encontradas nos diversos estudos, também podem ser explicadas em razão das condições epidemiológicas da região e distribuição geográfica do vetor além de exposição do animal ao vetor biológico (ARAÚJO et al. 2015). Outro fato que é muito

comum na clínica seria o animal já vir sendo monitorado com exames de hemograma seriado para acompanhar resposta ao tratamento instituído sem melhora clínica nem laboratorial, e outro resultado sorológico pode ocorrer acabando por superestimar este resultado visto que concentrou o número de animais negativos para ehrlichiose e sugestivos que são direcionados para o teste de diagnóstico para infecção por *Babesia* spp.

A soroprevalência para erlichiose foi de 34,3 % similar a diversos estudos em várias regiões brasileiras (CARLOS et al., 2011; VIEIRA et al., 2013; GUEDES et al., 2015; ROTONDANO et al., 2015) e inferior a outros estudos (OLIVEIRA et al., 2008; FUTURA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2015). É válido lembrar que assim como esses estudos, nossos resultados contemplam animais que são acompanhados com exames hematológicos seriados não sendo realizado sorologia como único método de diagnóstico. Já é de consenso na comunidade científica que o exame sorológico sozinho não diferencia animal na fase aguda, crônica ou subclínica, entretanto nossos resultados são de exames complementares ao ELISA, acompanhado de exame físico com sinais e sintomas quando presentes indicando desta forma animais doentes aptos a receberem o diagnóstico de erlichiose ou anaplasmose assim como tratamento adequado.

O diagnóstico de anaplasmose apresentou prevalência baixa no método de ES (0,0%) e com prevalência menor a *Ehrlichia* spp. no ELISA (11,4%) e maior a *Babesia* spp. no PCR (11,4%) em comparação aos outros agentes parasitários estudados. Fato este encontrado foi com diferença significativa em outras regiões como Paraná com prevalência no inverno de 60% (BAHIENSE et al., 2020; VIEIRA et al. 2013, RIBEIRO et al., 2017). Acredita-se que este hemoparasito seja transmitido por outros artrópodes potencialmente carreadores e transmissores de patógenos entre animais e seres humanos. Na região Sul esta prevalência é maior do que em outros estados (BROWN et al., 2005; RIBEIRO et al., 2017; BAHIENSE et al., 2020). Apesar de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ser incriminado na sua transmissão, ainda não foi possível comprovação devido as tentativas sem sucesso (SIMPSON et al., 1991). Alguns estudos não indicam testes sorológicos para enfermidades de baixa prevalência devido alta taxas de falsos positivos pela baixa especificidade do teste (MEDRONHO et al., 2009). O uso da PCR, apesar de ser considerado como padrão-ouro para o diagnóstico de hemoparasitoses, atualmente ainda não é uma realidade na clínica veterinária de pequenos animais na zona oeste do Rio de Janeiro, devido ao custo-benefício, sem contar com a possibilidade dos falsos-negativos em casos de agentes com baixa frequência e a metodologia necessitar de profissionais capacitados e com padrões pré-estabelecidos (MYLONAKIS et al., 2003).

Devido ao quantitativos de coinfecções encontradas com frequência torna-se inviável o diagnóstico preciso de várias hemoparasitoses em um mesmo momento para a diversidade de hemoparasitos (*Ehrlichia canis, Anaplasma platys, A. phagocytophilum, Babesia vogeli, Rangelia vitalli, Hepatozoon canis, D. immitis, Leishimania* spp., *Rickettisia* spp., *Mycoplasma haemocanis* e *Borrelia* spp.) presentes em nossa rotina clínica. Além disso em casos de resultados falso-negativos várias PCRs se fazem necessário para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, sendo possível esta conduta e metodologia somente em pesquisa científica devido ao custo alto (TRANCOSO et al., 2020).

Adicionalmente, temos uma realidade na clínica veterinária que já se popularizou com o uso da doxiciclina para doenças transmitidas por carrapato que abrange várias hemoparasitoses que respondem, em sua grande maioria, ao mesmo princípio ativo. Observamos em nossos dados prevalências menores com o uso da PCR em relação a alguns estudos no Brasil, enquanto em algumas regiões as prevalências variam também chegando a 65% (MOYA-ARAUJO et al., 2012; ROTONDANO et al., 2015; GOTTLIEB et al., 2016;
BAHIENSE et al., 2020). Razões diversas que já foram mencionadas como epidemiologia, biologia e ecologia de vetores (COSTA-JUNIOR et al., 2007; SZABÓ et al., 2013) são responsáveis pelos valores diversos e discrepantes, sem contar que não podemos deixar deconsiderar ao número reduzido de solicitações desses exames na rotina de uma clínica veterinária que tem forte influência em nossos resultados de biologia molecular, prejudicando na compilação de resultados para estudos epidemiológicos principalmente em estudos de análise espaço-temporal (MEDRONHO et al., 2009).

Os resultados da PCR para *Babesia* spp. (8,6%) são compatíveis com alguns estudos de nossa região (VILELA et al., 2013; PAULINO et al., 2018a) e maiores que alguns estudos em outras regiões do Brasil (SOUSA et al., 2013; MORAES et al., 2014; CASTRO et al, 2020). A investigação de vetores potenciais para *Babesia* spp precisa ser feita para verificar o que afirmou O'Dwyer et al. (2001) e O'Dwyer et al. (2009) de prevalências maiores na zona rural. Entretanto, nossos resultados são de animais provenientes de ambiente urbano, além de que a presença de cães adentrando em áreas preservada de Mata atlântica e sendo infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. principalmente *A. aureolatum* que apresenta uma ecologia e biologia parasitária diferente de *R. sanguineus* (SZABÓ et al. 2013), estudos recentes avaliam o potencial de cães domésticos na transmissão de *Rangellia vitalli* um agente da família Babesiidae (SOARES et al., 2018; FOURNIER et al., 2020).

Algumas variáveis inerentes ao hospedeiro são analisadas para verificar se influenciam no parasitismo de um artrópode, (carrapato / ixodideo) ou de hemoparasitos como agentes piroplasmideos (*Babesia* spp.) ou bactérias intracitoplasmáticas obrigatórias (*Ehrlichia* spp.ou *Anaplasma* spp.). Nesse contexto a prevalência das hemoparasitoses em nosso estudo não apresentou diferença significativa quando analisada entre macho/ fêmea (48,6%) / (51,4%) e entre cães com raça definida (CRD) e sem raça definida (SRD) (57,14%)/ (42,86%). Entretanto, quando comparado o parasitismo entre a faixa etária, os animais (>1ano) apresentaram maior prevalência com diferença significativa (62,86%)/ (37,14%). Esses dados são corroborados por Ribeiro et al., (2017) sendo um dos motivos dessa diferença o contato com ambiente maior e mais frequente depois que completa 1 ano de idade, ficando com maior exposição a infestação e patógenos transmitidos por carrapatos.

A associação de técnicas de diagnósticos de hemoparasitoses na clínica veterinária se faz necessário devido a vários fatores, dentre eles: a dificuldade na determinação da prevalência desses patógenos devido escolha de métodos com baixa sensibilidade (MYLONAKIS et al., 2003), de chegar a um diagnóstico definitivo e preciso sem o uso da biologia molecular (DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2009), devido a confirmação do diagnóstico de hemoparasitos não ser comum na prática da rotina veterinária sendo a infecção de *Babesia vogeli* confundida com outros hemoparasitos além de subnotificada (VILELA et al., 2013; PAULINO et al., 2018), e o uso indiscriminado da doxiciclina utilizando critérios inespecíficos como trombocitopenias para diagnóstico presuntivo de *Ehrlichia canis* (MACIEIRA et al., 2005).

Os resultados obtidos foram claros quando mostraram que para o diagnóstico de qualquer hemoparasito devemos ter critérios previamente estabelecidos e ter em mente que para um diagnóstico definitivo não podemos utilizar apenas um teste de diagnóstico (TRANCOSO et al., 2020; MEDEIROS et al., 2020).

Foi observado também que a ausência de diferença estatística nos resultados aqui apresentados não significa a superioridade ou inferioridade de um determinado teste diagnóstico, visto que a sorologia (anticorpos) e a biologia molecular (ácidos nucleicos: DNA/RNA) identificam marcadores biológicos diferentes respectivamente e consequentemente diferentes estágios da infecção.

Ao analisar a prevalência de animais positivos para hemoparasitoses no geral, sem especificidade parasitária, foi possível observar um perfil epidemiológico bem caracteristico, com prevalência de grupos expostos com resultados positivos que sobrepõe aos grupos de animais não expostos com resultados negativos caracterizando alta endemicidade.

Diante dos resultados deste trabalho, foi decidido reuinr todos os dados e avaliar as semelhanças no perfil dos animais para a formação de grupos que apresentavam resultados iguais qualitativamente, sendo possível formar 4 grupos com o perfil dos animais baseados em resultados de sorologia e PCR.

O perfil encontrado de animais com suspeita de hemoparasitose nesse estudo foi: grupo verdadeiro negativo a menor porcentagem (12,9%) dos animais não expostos, negativos na sorologia e negativos na biologia molecular. Em contrapartida obtivemos um maior percentual (87,1%) dos animais expostos, sendo (25%) com diagnóstico sorologico (-) e molecular (+); (31,4%) com diagnóstico sorologico (+) e molecular (+) e (30%) com diagnóstico sorologico (+) e molecular (-). Esse achado apresenta um padrão epidemiologico com elevado grau de positiidade para hemoparasitos com elevada discordância entre os métodos de diagnóstico, sugerindo elevada exposição aos hemoparasitos e seus vetores, indicando alta endemicidade nesta região (FONSECA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017; SILVEIRA et al., 2018).

Como toda avaliação de resultado de um ou mais testes de diagnóstico, é de extrema importância analisar cada caso em particular ou um grupo dos animais com o mesmo perfil de resultados de exames: clinicos, físicos, anamnese, histórico, queixa clinica, exames de hemograma e bioquimica como exames complementares. Entretanto todos os achados são inespecíficos e passiveis de erro se não forem avaliados exames sorológicos em conjunto com exames moleculares e no minimo 2 métodos de diagnóstico (TRANCOSO et al., 2020).

Após análise dos resultados, foi possivel observar: alta frequência de animais expostos ou infectados; baixa prevalência de animais totalmente negativos; elevada frequência de discordância diagnóstica visto que mais da metade (55,7%) de animais apresentaram perfil falso negativo (25,7%) com PCR (+) e sorologia (-) e perfil falso positivo (30%) com PCR (-) e sorologia (+). O achado desta elevada discordância diagnóstica entre sorologia e biologia molecular é importante em vários aspectos e é passivel de várias discussões.

No aspecto epidemiológico, alerta a importânica não somente de encotrar diagnóstico positivo e identificar agente causal, porém revela dados sobre a ciruclação do agente e gera informações para inqueritos que acompanham incidência, prevalência, taxas de mortalidade, estudos de sobrevida e além de circulação do agente etiológico em determinada região, como acontece na região Sul com *Ehrlichia* / *Anaplasma* (BAHIENSE et al., 2020).

No aspecto clinico-laboratorial leva ao conhecimento da importância em agrupar perfil de animais com mesma carcterisitca como, por exemplo, resultados falsos positivos que indicam cicatriz sorológica, fase crônica da doença sendo observada em exames

complementares que vão corroborar esse achado, baixa carga parasitária que será responsável pelo resultado de bilogia molecular negativo. Como conduta clinica vai orientar ao médico veterinário indicar punção de medula óssea ou de llinfonodos para pesqusia de DNA do agente etiológico para desvendar fase da doença aguda, subclínica ou crônica (OLIVEIRA, 2016).

No aspecto de profilaxia e controle, vai avaliar os responsáveis pelos cuidados com os cães em relação ao controle carrapaticida, uso de coleiras e pipetas repelentes, além de comprimidos carrapaticidas de uso oral (isoxazolinas), banhos carrapaticidas, frequência de passeios na rua ou em locais de grama onde aumenta o risco de infestação por carrapatos. Esse monitoramento semestral ou anual será importante para revelar falha na profilaxia e controle o que vai acusar novo diagnóstico positivo ou negativo na sorologia / PCR. Sendo necessária a associação dos testes sorológicos e PCR. (McCALL et al., 1994).

Diante desta associação para traçar o perfil do animal diante das hemoparasitoses, revela uma visão até então, não orientada para os profissionais de clinica médica, visto que revela as limitações entre os métodos de diagnóstico e não identificam necessariamente os mesmos animais positivos, ou seja, um animal positivo na sorologia não necessariamente é positivo como diagnóstico molecular e vice-versa (SILVEIRA et al., 2018; LARA et al., 2020)

Os sinais clinicos específicos e preditivos são fortemente compativeis com hemoparasitoses, porém os sinais clinicos não substituem a confirmação laboratorial devido à exsitência de várias patologias que cursam com alguns sinais caracterisiticos das hemoparsitoses. Os sinais encontrados nesse estudo, (Tabela 4) são fortemente compativeis com hemoparasitoses, porém não podem ser utilizados de forma isolada para fechar diagnóstico e direcionar tratamento, porque são sinais comuns a várias enfermidades encontradas como comorbidads com erliquiose e anaplasmose (Tabela 4) (SIPOV et al., 2008).

Os sinais clinicos sujestivos de hemoparasitoses não podem ser utilizados para definir diagnóstico porque não definem isoladamente infecção ativa, não distinguem fase aguda de crônica, não discrimina exposição prévia; não diferenciam coninfecções além de não identificar agente etiológico.

A diferença entre o ES e PCR está relacionado com o perfil da população de cães que são atendidos na clínica veterinária, a maioria dos animais apresentam sinais sugestivos de hemoparasitos por isso a prevalência da infecção ativa e doença aguda está mais presente e o exame mais sensível foi o que apresentou a maior prevalência. Isso foi encontrado em estudos de Ramos et al. (2009) em hospital veterinário com prevalência de 9% para *E. canis* e 21% *A.*

platys. Já o estudo de Bahiense et al. (2020) o resultado foi de 0% para *Ehrlichia canis*, e para *A. platys* a prevalência na PCR foi de 18,30%, que foi semelhante ao nosso resultado de *Anaplasma* spp. (11,4%) e inferior ao de *Ehrlichia* spp (37,10%). Esses dados diferentes entre os dois agentes mostram a importância do diagnóstico molecular em diferenciar as espécies além de mostrar a importância epidemiológica em diferentes regiões geográficas, sendo claro *A. platys* com maior prevalência na região sul e nordeste, enquanto que *E. canis* apresentou prevalência zero no Paraná. Esta discrepância pode ser explicado pela classificação das áreas de estudo de acordo com o clima, o que sugere que há diferentes espécies do vetor *R.sanguineus sensu lato* (uma temperada e outra tropical), conforme descrito por (MORAES et al., 2011), visto que a área em estudo pertence a uma banda de transição entre diferentes populações de *R. sanguineus sensu lato* que podem ser competentes ou não para atuar como vetores de *E.canis*, caracterizando desta forma, uma população com baixa competência vetorial (MORAES et al., 2015).

Quando avaliamos as técnicas de ES e ELISA para ambos os agentes da família Anaplasmataceae, observamos que as prevalências são distintas. O perfil desses animais são aqueles com diagnóstico sorológico positivo na maioria das vezes já foi exposto a doenças transmitidas por carrapatos, logo apresentam comumente cicatriz sorológica que é caracterizada por anticorpos circulantes que se mantem presentes por meses e pode chegar até anos ou ineficácia do organismo imunocompetente em debelar a infecção, permitindo desta forma detecção de altos títulos de anticorpos (HOSKINS, 1991; ALMOSNY, 2002). Logo quando são confrontados o exame ELISA desses animais com ES, que possui sensibilidade inferior, encontramos esse resultado, influenciado principalmente pelo diagnóstico de ES que muitas vezes, tende a zero, como observado em nosso estudo.

Em relação a comparação dos métodos de ELISA e PCR não apresentou uma grande diferença para *Ehrlichia* spp. visto que o número de animais positivos para os dois métodos foi próximo, 28 e 26 respectivamente. Como o teste rápido tipo ELISA é capaz de detectar animais na fase inicial da doença, com sinais e sintomas ajudam e reforçam o diagnóstico, logo este resultado foi confirmado com da PCR positiva. Com uso de PCR foi possível identificar animais verdadeiros positivos, corroborando com técnica mais sensível em relação as demais técnicas em estudo.

Entretanto para o diagnóstico de *Anaplasma* spp. devido a sua baixa prevalência nas regiões urbanas estudadas, em comparação com áreas rurais (COSTA-JUNIOR et al., 2007) que tem sua prevalência maior, nosso resultado foi diferente e na comparação das técnicas ELISA e PCR o diagnóstico sorológico foi igual a PCR relacionado a fase aguda da doença.

Logo temos animais com diagnóstico positivo visto que foi realizado a PCR para confirmar a presença de DNA do agente infeccioso, confirmando o diagnóstico de anaplasmose.

Quando analisamos os resultados para *Babesia* spp. houve diferença relevante na avaliação de apenas uma associação entre ES e PCR. A associação entre ES e ELISA não foi possível assim como entre ELISA e PCR devido falha em não possuir amostra suficiente de testes realizados de dot ELISA não sendo possível análise.

Como já foi relatado anteriormente que animais sem melhora clínica nem laboratorial, que estão constantemente expostos a antígenos através de infecções recidivantes permite que animal seja soro reagente porum período longo. O que é comum na rotina de clínicas, são animais que testam negativos para *Ehrlichia* spp. por muito tempo e continuam doentes, logo são direcionados a realizar dot- ELISA IgM para *Babesia* spp. e testam positivos com frequência alta de resultados que pode chegar a 93,31% (SILVA, 2022 - Dados não publicados) caracterizando um viés de seleção com valores superestimados. Nossos resultados para avaliação deste método foram realizados com amostragem por conveniência, onde todos os hemoparasitos apresentaram mesma razão de chances para ocorrência, e *Babesia* spp. apresentou prevalência de 8,6% na sorologia, corroborando com os dados na literatura (O'DWYER et al., 2009; LEAL et al., 2015; GOTTLIEB et al., 2016).

Em contrapartida, com a relação entre o método ELISA e PCR, os dois métodos foram sensíveis para detecção de patógenos na fase aguda e crônica, desde que haja presença de anticorpos para sensibilizar o primeiro método e DNA do patógeno no segundo respectivamente, para que haja concordância entre os dois métodos e nesse caso em especial foi o que aconteceu. Entretanto quando analisamos a avaliação do ES e PCR as duas metodologias avaliam o agente infeccioso no estado de infecção ativa com presença do parasito, houve diferença devido à baixa sensibilidade do primeiro em relação a maior sensibilidade do segundo, como foi relatado também na Paraíba e no Rio de Janeiro (ROTONDANO et al., 2015; PAULINO et al., 2018; BAHIENSE et al., 2020).

Os sinais clínicos sugestivos de hemoparasitoses se apresentaram comum a grande variedade de frequência em diversos sistemas fisiológicos. Nos distúrbios gastrointestinais, os sinais não relacionados com a suspeita de hemoparasitoses foram os que apresentaram diferença significativa, ou seja, animais na sorologia podem apresentar sinais clínicos distintos, onde podem estar com a mesma fase da doença em curso, seja ela aguda ou crônica (SIPOV et al., 2008; ROJAS et al., 2014), por isso não apresentaram diferença nos sinais hemorrágicos, podendo nesta fase, estar com anticorpos circulantes que sensibilizam o teste

para um grupo de animais positivos no ELISA e não seja detectado no grupo negativo. Vale lembrar que a sorologia utilizada no estudo é um teste rápido qualitativo e não quantitativo.

Ao comparar os resultados da PCR positivo e negativo, não houve diferença significativa em nenhum sinal clínico gastrointestinal nem de origem hemorrágica e nem de origem não hemorrágica. Uma explicação para este caso reside no fato de que podemos encontrar 4 grupos de animais como na Tabela 5. O primeiro grupo de animais com resultado positivo na PCR, mas não apresenta sinais clínicos, sendo considerado positivo assintomático, mas animal ainda não está doente, porém foi detectado DNA do agente infeccioso. O segundo grupo foi positivo na PCR, mas apresenta sinais clínicos, sendo considerado positivo sintomático, animal está doente e necessita de conduta terapêutica. O terceiro grupo foi negativo na PCR, porém com sinais clínicos sugestivos de hemoparasitose, sendo considerado negativo sintomático e precisa de acompanhamento ambulatorial. O quarto grupo, negativo na PCR e sem sinais clínicos, sendo considerado negativo verdadeiro, não necessitando de abordagem terapêutica, somente profilática como todos os animais em estudo.

Diante desta realidade, foi importante a associação de métodos de diagnóstico com os sinais clínicos por vários motivos: identificar em qual grupo os animais se encontram e o próximo passo, decidir o protocolo adequado e individualizado para cada animal (BULLA et al., 2004) e qual deles iniciariam protocolo terapêutico ou não, decisão esta, exclusiva do médico veterinário clínico de pequenos animais.

Os distúrbios hematológicos também foram expressivos e mostraram um mesmo perfil de animais como foi supracitado e detalhado na Tabela 4. Animais com diagnóstico positivo no ELISA apresentaram diferença significativa para a maioria dos distúrbios hematológicos encontrados no hemograma completo e apenas a linfopenia e neutropenia não apresentaram diferença significativa. Entretanto, trombocitopenia, anemia, leucopenia e epistaxe foram os distúrbios hematológicos de maior ocorrência, encontrados também na literatura (BULLA et al., 2004; RODRIGUES-VIVAS et al., 2005; ROCHA et al., 2016). Animais com este perfil hematológico, são caracterizados com maior frequência na fase aguda ou crônica da doença (BREITSCHWENDT, 1997; BULLA et al., 2004; RODRIGUES-
VIVAS et al., 2005; LEMOS
et. al., 2017) sendo necessário para diagnóstico preciso e definitivo associação entre achados clínicos, laboratoriais e diferentes métodos diagnósticos (BULLA et al., 2004; YABSLEY et al., 2008; TRANCOSO et al., 2020) para identificar o principal agente causador dentre as inúmeras hemoparasitose encontradas na clínica veterinária.

A linfopenia e neutropenia foram alterações hematológicas que chamaram a atenção, visto não apresentarem grande variabilidade entre os grupos positivos e negativos tanto no ELISA como na PCR. Esse tipo de alteração está relacionado com processo imunitário principalmente, que de acordo com o perfil do animal frente a infecção, é uma alteração preocupante porque está relacionada com supressão medular (OLIVEIRA et al. 2000; CASTRO et al. 2004, CASTRO et al., 2020) e presente em animais que estão em cursode fase crônica, sendo em alguns casos, necessário uso de estimulantes de colônia de granulócitos (rhG-CSF) para combater neutropenia febril, linfopenia e leucopenia (LUCIDI; TAKAHIRA, 2007).

Alterações de origem hematológica são importantes, visto que se trata de pelo menos três hemoparasitose com tropismo para o sistema hematopoiético e com prevalência endêmica nas clínicas veterinárias no Rio de Janeiro. Um dos distúrbios que merece destaque de sua frequência associada aos diferentes métodos de diagnóstico é a epistaxe. Esse distúrbio foi o único associado a leucopenia que se apresentou com diferença significativa nos diferentes grupos com resultados de ELISA e PCR positivos, visto que 100% dos animais com epistaxe foram positivos no ELISA e 80% positivos na PCR, caracterizando principalmente doença na fase aguda. A epistaxe relacionada as plaquetas é um achado comum na fase aguda da doença aumentando a suspeita de infecção por *Ehrlichia* spp. (BULLA et al., 2004; RODRIGUES-VIVAS et al., 2005).

Os distúrbios ortopédicos, neurológicos, viscerais, oftálmicos e respiratórios, apesar de não se apresentarem com prevalência significativa entre os testes sorológicos e moleculares, são importantes nesta análise (CODNER et al., 1985; LEIVA et al., 2005; TOOM et al., 2016; ROCHA et al., 2016), visto que se fizeram presentes com muitos animais positivos e negativos na PCR. Apesar de alguns sinais serem inespecíficos e muitos animais não terem recebido o diagnóstico da PCR em tempo hábil para tratamento, esses sinais apresentaram correlação com a infecção visto que desapareceram após tratamento empírico baseado apenas no diagnóstico sorológico positivo. Logo a grande maioria desses animais apresentaram cura clínica e laboratorial após uso de doxiciclina 5 mg/kg/bid por 28 dias (MYLONAKIS et al., 2019).

Os animais que apresentaram coinfecções como piometra, cinomose, pancreatite, leptospirose e parvovirose, possivelmente estavam cursando com a fase crônica da doença, visto que os sinais clínicos isoladamente não devem ser usados como um parâmetro definitivo da infecção por hemoparasitose, pois são inespecíficos, podendo estar presentes em outras doenças, infecciosas ou não. Além disso, a variação na fase da doença na qual os animais se

encontram, interfere diretamente no aparecimento desses sinais (ROCHAet al., 2016), além do diagnóstico diferencial ser importante para a detecção de enfermidades concomitantes e comorbidades. Desta forma o tratamento eficaz de todas as enfermidades que acomentem os animais naquele momento tão delicado e desafiante, é crucial para o prognóstico do paciente.

Na comparação entre os métodos de diagnósticos com maior detalhe na Tabela 6, foi possível encontrar grupos de animais possivelmente com perfil de doença crônica ou aguda com alguns exemplos de resultados falso positivos e falso negativos no diagnóstico de ELISA. Ao comparar esses grupos de animais foi possível encontrar diferença entre dois grupos: animais positivos / negativos (B x C) e animais negativos / falso positivos (B x D). Esses resultados só foram possíveis com aassociação de dados clínicos, laboratoriais e utilização de diferentes métodos para o diagnóstico definitivo, corroborando com os dados de Rocha et al. (2016).

Estudos que avaliam a comparação entre testes diagnósticos (NAKAGHI et al., 2008; MENESES et al., 2008; RAMOS et al., 2009; CARLOS et al., 2011; FONSECA et al., 2017; TRANCOSO et al., 2020; BAHIENSE et al., 2020) mostraram a importância de cada método sendo capaz de diferenciar o perfil epidemiológico de cada hemoparasito em determinada região, que no caso do *A.platys*, *E.canis* foi bem evidente sua prevalência em diferentes regiões do Brasil. (CARLOS et al., 2011; TRANCOSO et al. ,2020; BAHIENSE et al., 2020). A PCR é o método mais confiável e superior ao ES no diagnóstico das infecções por agentes da Família Anaplasmataceae. (DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2009) e para outros hemoparsitos também (TRANCOSO et al., 2020) estando de acordo com estudos recentes realizados no Rio de Janeiro (PAULINO et al., 2018a; PAULINO et al., 2018b). Entretanto, amostras negativas na PCR e positivas no ELISA podem indicar infecção ou não, portanto o Médico Veterinário deve ter em mente que os exames clínicos são extremamente importantes e que a penas um teste de diagnóstico não é suficiente para determinar se um cão tem hemoparasitose ou não, e a complementação de um teste molecular e um teste sorológico será extremamente útil para fechar um diagnóstico (ROCHA et al., 2016; MEDEIROS et al. 2020).

5 CONCLUSÃO

Os sinais clínicos e hematológicos foram fortementes prognósticos para a suspeita de animais infectados por hemoparasitos, principalemnte por *Ehrlichia canis* visto haver maior concordância diagnóstica entre sorologia e biologia molecular com diferença estatisticamente significativa;

A qPCR foi considerada a técnica complementar e sensível em corcondânica com a sorologia para o diagnóstico de *Ehrlichia* spp. *Anaplasma*spp. e *Babesia* spp.

A associação de sinais clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares foi capaz de selecionar o perfil de animais falsos positivos e negativos para hemoparasitoses além de identificar animais doentes e sadios.

O Teste Dot-ELISA IgM apresentou a sensibilidade para o diagnóstico de *Babesia* com alta concordância com a bilogia molecular;

O presente estudo revela uma área endêmica com o percentual de animais expostos e doentes maior 6,7 vezes que os animais não expostos e sadios para hemoparasitoses

O diagnóstico dos cães positivos para Borreliose de Lyme necessita de novos estudos para corroborar este achado , visto que será o próximo passo em nosso grupo de pesquisa

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente o cenário epidemiológico de doenças transmitidas por vetores, com ênfase em carrapatos, pulgas e mosquitos, tem sido um grande desafio, visto que a cada dia temos o diagnóstico de doenças infecto-parasitárias de forma oculta e tardia levando o médico veterinário a ter um olhar investigativo acurado e de não se contentar de imediato com o resultado negativo do primeiro teste diagnostico.

A rotina de uma clínica veterinária de pequenos animais, exige do profissional de clínica médica, um olhar único para cada caso clinico, devido as particularidades em que o animal no contexto epidemiológico poderá estar inserido, devendo levar em consideração quais os fatores de risco o mesmo pode estar submetido e qual estratégia deverá traçar para um diagnóstico rápido, preciso e assertivo.

No que concerne o estudo de hemoparasitoses, o perfil dos animais observados em ambiente urbano revela um percentual de animais exposto e doentes maior que o de animais não expostos e saudáveis. Além de animais crônicos subclínicos que só vão para emergência quando agudizam e logo recebem diagnóstico positivo de ehrlichiose, anaplasmose e dirofilariose principalmente e muitas vezes já é tarde para o sucesso do tratamento e cura.

A evolução da medicina veterinária no contexto dos cuidados paliativos, levou ao profissional a usar de todas as suas ferrmentas do conhecimento e disponibilizar de um arsenal de exames imunológicos, moleculares, imaginológicos, minimamente invasivos como punção de medula óssea, aspirado de baço, punção aspirativas com agulha fina entre outros, onerosos e complexos até então não explorado há décadas devido a demanda pelo desejo de cura do seu animal oferecendo qualidade de vida até o fim.

O presente trabalho veio com a inovação de apresentar uma pesquisa descritivas e analítica que relata um pouco da rotina de um médico veterinário de clínica médica no ambiente urbano em uma das principais capitais do Brasil e seus desafios para atender o perfil dos cães expostos a diversas enfermidades, o seu diagnóstico, controle, tratamento e profilaxia das principais hemoparasitoses que acometem os cães na cidade do Rio de Janeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. G. Clinicopathological characteristics of canine babesiosis and its treatment with imidocarb dipropionate. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 34, n. 10, p. 1317-1323, Oct. 1973.

AGRESTI, A. **Categorical Data Analysis**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.

ALBERNAZ, A.P.; MIRANDA, F.J.B.; MELO, A.O.; MACHADO, JÁ; FAJARDO, H.V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202p. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 1998.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. 1ª ed. Rio de Janeiro: **L.F.Livros**, 2002. p.13-56.

ARAÚJO, A.C.; SILVEIRA, J.A.G.; AZEVEDO, S.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; RIBEIRO, M.F.B.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C. *Babesia canis vogeli* infection indogsandticksin the semiarid region of Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n.5, p. 456-461, 2015.

BAHIENSE, C.R.; MATOS, A.C.; ABATE, H.L; SANTOS, N.J.R.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Babesia vogeli*, *Mycoplasma* spp., *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* spp. in a hospital dog population of western Paraná, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, supl. 2, p. 3133-3144, 2020.

BASSI, P.B.; MOREIRA, T.K.; SILVA, C.C.; BITTAR, E.R.; BITTAR, J.F.F. Aspectos clínicos, epidemiológicos, hematológicos e sorológicos de animaisdiagnosticados com *Ehrlichia canis* no HospitalVeterináriode Uberaba-MG **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, n.31, p. 678-680, 2011.

BEVERIDGE, E. Babecidal activity of imidocarb [3,3'-bis-(2-imidazolin-2-yl) carbanilide] in mice. **Research in Veterinary Science**, London, v. 10, n. 6, p. 534-539, 1969.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.3, p. 566-571, 2009.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; QUROLLO, B.A.; SAITO, T.B.; MAGGI, R.G.; BLANTON, L.S.; BOUYER, D.H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites & Vectors**, v.7, n. 298, p. 1-7, 2014.

BROWNG, K.; MARTINA. R.; ROBERTST. K.; DUNSTANR. H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. **AustralianVeterinaryJournal**, v.

83, n. 1, p. 101-102, 2005.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; PAPAROTTO, T.; LANGRAFE, L.; PAES, P.R.; LOPES, R.S. Fase aguda da Ehrlichiose monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. **Medvep** R**evista Cientifica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais de Estimação**, v. 2, n. 6, p. 82-85, 2004.

CARLOS, R.S.A.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; ALMOSNY, N.R.P.; ALBUQUERQUE, G.R. Risk factors and clinical disordersof canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasielira de Parasitologia Veterinaria**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2011.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, C. A. TINUCCI COSTA, M. Experimental acute canine monocytic erhlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary. Parasitologic**, v. 119, n. 1, p. 73-86. 2004.

CASTRO, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; AQUINO, L.P.C.T.; DAGNONI, A.S.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T.; NAKAGHI, A.C.H.; SANTI, M.; CALCHI, A.C.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Immunophenotypical and pathological changes in dogs experimentally infected with Ehrlichia canis, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** v. 31, v. 2, p. 1-13, 2022.

CASTRO, V.V.; AYRES, E.C.B.S.; CANEI, D.H.; PEREIRA, M.E.; SOUSA, V.R.F.; CHITARRA, C.S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; ALMEIDA, A.B.P.F. Molecular prevalence
and factors associated with *Babesia vogeli* infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil, **Ciência Rural**, v.50, n.2, 2020.

CHAEJ, S.; YU, D.H.; SHRINGI, S.; KLEIN, T.A.; KIM, H.C.; CHONG, S.T.; LEE, I.Y.; FOLEY, J. Microbial pathogens in ticks, rodents and ashrew in northern Gyeonggi-donearthe DMZ, Korea. **Journal Veterinary Science**, v. 9, n. 3, p. 285-293, 2008.

CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G.Achados atípicos em 16 casos de erliquiose canina. **Journal of the AmericanVeterinary Medical Association**, v.186, n.2, p. 166 -169, 1985.

CORDEIRO, M.D.; BAHIA, M.; MAGALHÃES-MATOS, P.C.; CEPEDA, M.B.; GUTERRES, A.; FONSECA, A.H. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 555-561, 2018.

CORDEIRO, M.D.; MEIRELES, G.S.; SILVA, J.B.; SOUZA, M.M.S.; FONSECA, A.H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 3, p. 251-256, 2012.

CORRADI, D.A.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D. Anticorpos para *Borrelia burgdorferi* em indivíduos que trabalham com animais silvestres. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 966–968, 2006.

COSTA, I.P.; BONOLDI, V.L.N.; YOSHINARI, N.H. Search for *Borrelia* sp. in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the State of Mato Grosso do

Sul, Brazil: A short report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5. p. 631-635, 2002.

COSTA, V.C.; MOURA, J.R.S. Análise do potencial turístico nas regiões administrativas (RAs) de Campo Grande e Guaratiba zona oeste do Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Investigaciones geográficas**, v. 52, n. 1, p. 137-152, 2003.

COSTA-JUNIOR, L.M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M.F.B.; BEELITZ, P.; KURTPFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal,** v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

COTA, J.M.; OROZCO, A.M.O.; BEDOYA, S.A.O.; OLIVEIRA, A.C.; VILORIA, M.I.V.; COSTA, P.R.S. Babesia spp. no líquido peritoneal em cão com ascite - relato de caso, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1109-1114, 2018.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira deParasitologia Veterinária**, v. 18,n. 4,p. 20-25, 2009.

DAS, M.; KONAR, S. Clinical and hematological study of canine Ehrlichiosis with other hemoprotozoan parasites in Kolkata, West Bengal, India, **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 11, p. 913-915, 2013.

DA SILVA, C.B.; SANTOS, H.A.; NAVARRETE, M.G.; RIBEIRO, C.C.D.U.; GONZA-LEZ, B.C.; ZALDIVA, M.F.; PIRESM. S.; PECKLEM; DA COSTA, R.L.; VITARI, G.L.V. Molecular detectionan dc characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba. **Tick and Tick Borne-Diseases**, v. 7, n. 2, p. 938-944, 2016.

JEFFRIES, R; CHAU, S. C. M.; TAM, W. A. M.; RYAN, U M.; MONIS, P; REEVE-JOHNSON, L. An alternative combination therapy with metronidazole, clindamycin and doxycycline for *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Hong Kong. **Parasites & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 385-394, Aug. 2020.

FUSSGÄNGER, R.; BAUER, F. B.: ein neues Chemotherapeuticum gegen Piroplasmoses und Trypanosomoses. **Medizin und Chemie**, Leverkusen, v. 6, p. 504-531, 1958.

FONSECA, J.P.; BRUHN, F.R.P.; RIBEIRO, M.J.M.; HIRSCH, C.; ROCHA, C.M.B.M.; GUEDES, E.; GUIMARÃES, A.M. Hematological parameters and seroprevalenceof*Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. **Ciência Animal Brasileira**, v.18, n. 1, p. 1-9, 2017.

FURUTA, P.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; TEIXEIRA, M.C.A.; ROCHA, A.G.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 41-45, 2009.

GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M.R.; SOARES, J.F.; GONÇALVES, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; COSTA, M.M.; LABRUNA, M.B.; BORTOLINI, C.E.; MACHADO, R.Z.; VIEIRA, M.I.B. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 172-178, 2016.

GUEDES, P.E.B.; OLIVEIRA, T.N.A.; CARVALHO, F.S.; CARLOS, R.S.A.;

ALBUQUERQUE, G.R.; MUNHOZ, A.D.; WENCESLAU, A.A.; SILVA, F.L.Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brasil **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 115-121. 2015.

GUIMARÃES, A M; ROCHA, C M B. M.; OLIVEIRA, T M F. S.; ROSADO, I R.; MORAIS, L G.; SANTOS, R R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias no município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 49-53, dez. 2009.

HEIENE, R.; KRISTIANSEN, V.; TEIGE, J. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and longterm clinical outcome with respecttosigns of kidney disease. **ActaVeterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 13, p. 1-9. 2007.

HOSKINS, J.D., Tick-borne Zoonoses: Lyme disease, Ehrlichiosis and Rocky Montain Spotted Fever**. Small Animal**, v.6, n.3, p. 236-243, 1991.
JENSCH, R. 4,4'-Diamidino-diazoaminobenzol, ein neues Mittel gegen Trypanosomen- und Piroplasmen-Infektionen. **Arzneimittel-Forschung**, Aulendorf, v. 5, n. 3, p. 134-135, 1955.

JOJIMA, F.S.; GARCIA, J.L.; VIDOTTO, M.C.; BALARIN, M.R.S.; FABRETTI, A.K.; GASPARINI, M.R.; COELHO, A.L.M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Vet**erinária, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSSM, L.Clinical biochemistry of domestic Animals, 6th ed. Academic Press, New York, 2008. 896p.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.6, n.30, p.24-32, 2001.

LARA, B B B; CONAN, A; THRALL, M A H; KETZIS, J K.; BRANFORD, G C; RAJEEV, S. Serologic and molecular diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* infection in dogs in an endemic region. **Pathogens**, Basel, v. 9, n. 6, p. 488-499, jun. 2020.

LEAL, P.D.S.; MORAES, M.I.M.R.; BARBOSA, L.L.O.; LOPES, C.W.G. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 1, p. 55-62, 2015.

LEIVA, M.; NARANJO, C.; PEÑA, M.T. Sinais oculares da erliquiose monocítica canina: um estudo retrospectivo em cães de Barcelona, Espanha. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.6, p.387-393,2005.

LEMOS, T.D.; CERQUEIRA, A.M.F.; TOMA, H.K.; SILVA, A.V.; CORRÊA, R.G.B.; PALUDO, G.R.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southe ast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 137-142, 2012.

LEMOS, T. D.; TOMA, H. K.; ASSAD, R. Q.; SILVA, A.V.; CORRÊA, R. G. B.; ALMOSNY, N. R. P. Clinical and hematological evaluation of *Rangelia vitalii*-naturally infected dogs in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26,

n. 3, p. 307-313, 2017.

LUCIDI, C.A.; TAKAHIRA, R.K. Uso do estimulante de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 915-920, 2007.

McCALL, J.W.; GENCHI, C.; KRAMER, L.H.; GUERRERO, J.; VENCO, L. Heartworm diseasein animals and humans. **Advances in Parasitology**, v**.** 66, n.4, p. 193-285, 2008.

McCALL, J.W.; CALVERT, C. A.; RAWLINGS, C. A. Heartworm infection in cats: a life-threatening disease. **Veterinary Medicine**, v. 89, n. 7, p. 639-647, 1994.

MACIEIRA, D. B; MENEZES, R C M; DAMICO, C B; ALMOSNY, N R P; SOUZA, A J S; CHRYSSAFIDIS, A L; SCOTTI, C S; CUNHA, N R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MEDEIROS, M.A.S.; SILVA, M.H.; MATTA, M.A.V.; FERREIRA, E.O.; MACHADO, S.L.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B.; TOMA, H.K.; XAVIER, M.S.; MEIRELLES, M.N.S.L.; ALMOSNY, N.R.P. Expression and antigenic analysis of there combinant TRP36 protein from *Ehrlichia canis* São Paulo strain for serologic tests, **Brazilian Journal Veterinary Parasitology,** v. 29, n. 3, p. 1-12, 2020.

MEDRONHO, R.A.;BLOCH, V.K.; LUIZ, R.R.; WERNECK, G.L. Epidemiologia.SãoPaulo. Atheneu.2009.

MENESES, I.D.S.; SOUZA, B.M.P.S.; TEIXEIRA, C.M.M.; GUIMARÃES, J.E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

MORAES, J.F.; KRAWCZAK, F.S.; COSTA, F.B.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLos One**, v. 10, n. 9, p. 1- 9, 2015.

MORAES, J.F.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MOYA-ARAUJO, C. F.; BATISTA, G. D. H.; RIBEIRO, M. G.; STURION, T. T.; ARAÚJO, D. C.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Correlação dos achados clínicos e hematológicos com diagnóstico definitivo de erliquiose canina por meio de PCR. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2301-2306, 2012.

MYLONAKIS, M.E.; HARRUS, S.; BREITSCHWERDT, E.B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The Veterinary Journal**, v. 246, n. 1, p. 45-53, 2019.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the

diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, 9, n. 2, p. 197–204, 2003.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, **Ciência Rural**, v.38, n. 3,p. 766-770, 2008.

O'DWYER, L H; MASSARD, C L; SOUZA, J C P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

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

OJEDA-CHIA, M.M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ESTEVE-GASENT, M.D.; LEÓNC, A.A.P.; MODARELLI, J.J.; VILLEGAS-PEREZA, S.L. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 67, n. 1, p. 1-6, 2019.

OLIVEIRA, B.C.M. Detecção molecular de *Ehrlichia canis* em cães e em órgãos de seus respectivos carrapatos. 2016. 31p. Dissetação (Mestrado). **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Araçatuba, São Paulo. 2016.

OLIVEIRA, T M F. S; FURUTA, P I; CARVALHO, D; MACHADO, R Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 7-12, 2008.

PAULINO, P.G.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PECKLE, M.; COSTA, R.L.; VITARI, G.V.; VILELA, J.A.R.; ABREU, A.P.M.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A. Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the South eastern region of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.13, n. 1, p.160-165, 2018a.

PAULINO, P.G.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PECKLE, M.; COSTA, R.L.; VITARI, G.V.; VILELA, J.A.R.; ABREU, A.P.M.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brasil. **Preventive Veterinary Medicine,** v. 159, n. 1, p. 135-142, 2018b.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for StatisticalComputing,Vienna,2019.Disponivel<https://www.RProject.org/.http://webcanine.com/wp-content/uploads/2007/04/risk.pdf>Acesso em 17mar2019.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES, D.S.; SOUZA, I.I.F.; ONO,T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.O.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 58-62, 2009.

RIBEIRO, C.M.; MATOS, A.C.; AZZOLINI, T.; BONES, E.R.; WASNIESKI, E.A.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; SIMONE, B.; LUCHEIS, S.B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* instraydogs in Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37,n. 2,p.129 –136, 2017.

RIKIHISA, Y. Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses and humans. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 250-251, 2000.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingi i*infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2107-212, 1994.

ROCHA, J.M.; CARVALHO, F.S.; OLIVEIRA, H.C.; CARLOS, R.S.A.; CARNEIRO, P.L.S.; ALBUQUERQUE, G.R.; WENCESLAU, A.A. Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães com alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, no município de Ilhéus, Bahia, **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, v. 38, n. 4, p. 345-352, 2016.

RODRIGUES-VIVAS, R.I.; ALBORNOZ, R.E.; BOLIO, G.M. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology Amsterdam**, v. 127, n. 1, p. 75-79, 2005.

ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V.; GUTIÉRREZ, R.; YASUR-LANDAU, D.; BANETH, G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis in* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection, **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3, p. 121– 128, 2014.

ROTONDANO, T.E.F; ALMEIDA, H.K.A.; KRAWCZAK, F.D.S.; SANTANA, V.L.; VIDAL, I.F.; LABRUNA, M.B.; MELO, M.A.D. Surveyof *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista BrasileiradeParasitologia Veterinaria,** v. 24, n. 1, p. 52-58, 2015.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.; COSTA, R.L.; SANTOS, M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites &Vetors**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.

SANTOS, R R; GUIMARÃES, A M; ROCHA, C. M.B. M.; OLIVEIRA, T M F. S.; ROSADO, I.R.; MORAIS, L. G. Investigação epidemiológica de hemoparasitoses e zoonoses em populações caninas sob atendimento clínico em Minas Gerais. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 98, p. 54-62, 2012

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic Indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1, p. 131-138, 2008.

SILVA, M.C.A.; MUNDIM, A.V.; MENDONÇA, G.A.; MUNDIM, M.J.S.; GUIMARÃES, E.C. Hemoparasites in domestic naturally infected dogs, from urban and rural área of Abadia dos Dourados municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Bioscience Journal,** v. 30, n. 2, p.

892-900, 2014.

SILVA, S.R. Levantamento epidemiológico de carrapatos em cães assistidos em duas unidades privadas de serviço de saúde animal na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. 2016. 54p. (Dissertação). RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016.

SILVA, S.R.; LOURENÇO, E.C.; TASSINARI, W.S.; FAMADAS, K.M. Estudo descritivo da
Série histórica de ocorrência de carrapatos em cães assistidos em duas unidades privadas de saúde animal na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 171-177, 2016.

SILVEIRA, A P S; VIEIRA, V B D; BATALINI, L S; CARMO, S B; FRIOZI, E; ARRUDA, E J ; LIMA JUNIOR, M S C; NEITZKE-ABREU, H C. PCR sensitivity of peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 51, n. 6, p. 843-847, 2018.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W.Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* asa potential biologic vetor of *Ehrlichia platys,* **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n.9, p.1537 -1541, 1991.

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.S.F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de For a, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006.

SOARES, J.F.; COSTA, F.B.; GIROTTO-SOARES, A.; SILVA, A.S.; FRANÇA, R.T.; TANIWAKIA, A.S.; DALL'AGNO, B.; RECK, J.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliosis. **Ticks and Tick-borne Diseases** v. 9, n. 5, p. 1221-1234, 2018.

SOUZA, K. C. M.; ANDRÉ, M. R.; HERRERA, H. M.; ANDRADE, G. B.; JUSI, M. M. G.; SANTOS, L. L.; BARRETO, W. T. G.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, G. P. Molecular detection of Ehrlichia canis in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 114-118, 2013.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. **Manual devigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004. p.62.

SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fevertick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellularand Infection Microbiology**, v. 3, n. 27, p. 1-9, 2013.

SZABÓ, M. P. J.; MACHADO, R. Z.; MARCILI, A.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. Competência Vetorial de carrapatos do grupo Rhipicephalus sanguineus do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão de bactéria Ehrlichia canis, agente etiológico da erliquiose

monocítica canina. 2013.

THOMAS, A. D.; NEITZ, W. O. The importance of diseases in wild animals. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 30, p. 419-425, 1933.

TOOM, M.L.D.; DOBAK, T.P.; BROENS, E.M.; VALTOLINA, C. Interstitial pneumonia and pulmonary hypertension associated withsuspected ehrlichiosis ina dog **Acta Veterinary Scandinavica**, v. 58, n. 46, p. 1-8, 2016.

TRANCOSO, T.A.L.; LIMA, N.C.; BARBOSA, A.S.; LELES, D.; FONSECA, A.B.M.; LABARTHE, N.V.; BASTOS, O.M.P.; UCHÔA, C.M.A. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 1, 2020.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **VeterinaryParasitology**, v.140, n. 3, p. 223-230, 2006.

VIEIRA, T.S.W.J; VIEIRA, R.F.C.; NASCIMENTO, D.A.G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDON, R.S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 104-109, 2013.

VIERA-NETO, O.M.; MOYSES-NETO, M.; DANTAS, M.Glomerulopatias nos idosos. In: BARROS, R.T.; ALVES, M.A.R.; DANTAS, M. Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. p. 437-450.

VILELA, J.A.R.; PIRES, M.S.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; FALQUETO, A.; SANTOS, H.A.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H. Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v. 35, n. 1, p. 63-68, 2013.

YABSLEY, M.J.; McKIBBEN, J.; THOMAS, R.E.; PELS, M. E.; REEVES, W.K.; CHANDRASHEKAR, R.; STARKEY, M.A.; KAMER, K.; PATTERSON, G.T.; GALLAGHER, T.; O'CONNOR, J. T.; LOFTON, K.; TRENTON, J.; GONZALEZ, C.A. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology,** v. 151, n. 2-4, p. 279-285, 2008.

ANEXO 1: Comissão de Ética / UFRRJ

UFRRJ
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária

CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo retrospectivo das principais hemoparasitoses em cães e avaliação dos métodos de diagnóstico utilizados em Unidades Privadas de Saúde Animal", protocolada sob o CEUA nº 7113280818 (ID 001111), sob a responsabilidade de **Teresa Cristina Bergamo do Bomfim** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 09/11/2018.

We certify that the proposal "A retrospective study of the main hemoparasitoses in dogs and evaluation of diagnostic methods used in Animal Health Private Units", utilizing 2000 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7113280818 (ID 001111), under the responsibility of **Teresa Cristina Bergamo do Bomfim** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 11/09/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2018 a 12/2020 Área: Parasitologia Animal

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 240 meses	N:	2000
Linhagem:	várias raças			Peso:	150 a 50000 g		

Local do experimento: Unidades Privadas de Saúde Animal.

Seropédica, 09 de novembro de 2018

Fabio B. Scott

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

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro