

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

LUIS FERNANDO CERRO TEMOCHE

Detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. e agentes da Ordem  
Piroplasmida em cães, e seus carrapatos, da região metropolitana da Província de Piura,  
Piura-Peru.

NITERÓI  
2017

LUIS FERNANDO CERRO TEMOCHE

Detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. e agentes da Ordem  
Piroplasmida em cães, e seus carrapatos, da região metropolitana da Província de Piura,  
Piura-Peru

Tese apresentada à Banca Avaliadora do  
Programa de Pós-graduação em Medicina  
Veterinária - Clínica e Reprodução Animal da  
Universidade Federal Fluminense como requisito  
parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dra. NADIA REGINA PEREIRA ALMOSNY

NITERÓI

2017

LUIS FERNANDO CERRO TEMOCHE

Detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. e agentes da Ordem Piroplasmida em cães, e seus carrapatos, da região metropolitana da Província de Piura, Piura-Peru

Tese apresentada à Banca Avaliadora do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Clínica e Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Aprovado em 20 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Nádia Regina Pereira Almosny - Orientadora  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dra. Nathalie Costa da Cunha  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Didonet Lemos  
Centro Universitário Serra dos Órgãos

---

Prof. Dra. Helena Keiko Toma  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Matheus Dias Cordeiro  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Niterói, RJ

2017

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micrómetros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Ag-Ab</b>	Antígeno anticorpo
<b>AHIM</b>	Anemia hemolítica imunomediada
<b>APP</b>	Anticorpos antiplaquetários
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>C</b>	Citosina
<b>CDC</b>	Centro de controle e Prevenção de Doenças (do inglês - Center for Disease Control and Prevention)
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética de Pesquisa com Animais
<b>CID</b>	Coagulação intravascular disseminada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
<b>Dr.</b>	Doutor
<b>Dr.a</b>	Doutora
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>EGC</b>	Ehrlichiose Granulocítica Canina
<b>EGH</b>	Ehrlichiose Granulocítica Humana
<b>ELISA</b>	Ensaio imuno enzimático (do inglês —enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>EMC</b>	Ehrlichiose Monocítica Canina
<b>EMH</b>	Ehrlichiose Monocítica Humana
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FM</b>	Febre Maculosa
<b>FMB</b>	Febre Maculosa Brasileira
<b>g</b>	Gravidade
<b>G</b>	Guanina
<b>GFM</b>	Grupo da Febre Maculosa
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de monócitos e granulócitos

<b>gp</b>	Glicoproteína
<b>GT</b>	Grupo tífico
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HVU</b>	Hospital Veterinário Universitário
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IGN</b>	Instituto Geográfico Nacional
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>INEI</b>	Instituto Nacional de Estatística e Informática (do espanhol - Instituto Nacional de Estadística e Informática)
<b>INS</b>	Instituto Nacional de Saúde
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>LAMADIN</b>	Laboratório de Pesquisa Clínica e Molecular Marcílio Dias do Nascimento
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>M</b>	Molar
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>Mb</b>	Megabase
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>MHCII</b>	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>n.</b>	Número
<b>NAD</b>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânions superóxido
<b>p.</b>	Página
<b>PAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos

<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PI</b>	Piauí
<b>PMIF</b>	Fator de migração plaquetária
<b>PPT</b>	Proteína plasmática total
<b>DNAr</b>	DNA ribossômico
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RGFM</b>	Rickettsias do grupo da Febre Maculosa
<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>RJ</b>	Rio de Janeiro
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rOmpA</b>	Proteína de superfície de membrana A
<b>rOmpB</b>	Proteína de superfície de membrana B
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucléico ribossomal
<b>SDMO</b>	Síndrome da disfunção múltipla de órgãos
<b>SENAMHI</b>	Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología
<b>SIGE</b>	Sistema de informação Geográfica para empreendedores (do espanhol - Sistema de Informacón Geográfica para Emprendedores)
<b>SMF</b>	Sistema mononuclear fagocitário
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TCC</b>	Trombocitopenia Cíclica Canina
<b>TGF-β</b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>Th</b>	Linfócitos T auxiliares
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>U</b>	Unidade internacional de medida
<b>UFF</b>	Universidade Federal Fluminense
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UFPI</b>	Universidade Federal do Piauí
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas

## RESUMO

Erliquiose, Rickettsiose e Babesiose têm sido identificadas como causa crescente de morbidade e mortalidade de caninos e, em alguns países, do homem, em virtude da maior exposição a locais onde é comum a presença de carrapatos. O objetivo deste trabalho foi obter informações epidemiológicas sobre as infecções e presença dos agentes de membros Ordem Rickettsiales e agentes da Ordem Piroplasmida, que acometem cães, e seus carrapatos, da região Metropolitana da Província de Piura, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Nested-PCR, polimorfismos de restrição de fragmentos amplificados (RFLP), Sequenciamento e Análise filogenética, assim como determinar as espécies envolvidas nas infecções, e conhecer a fauna de Ixodídeos presentes nessa região. Além das amostras de sangue (216) e carrapatos (984), foram coletadas informações sobre os cães e seus proprietários como: faixa etária, sexo, presença de carrapatos, estrato socioeconômico e convivência com outros animais. Dos 984 carrapatos, apenas três espécies de carrapatos foram identificadas, *Rhipicephalus sanguineus* (977), *Amblyomma triste* (seis) e *Amblyomma tigrinum* (um). Estes foram classificados morfológicamente por estágio, espécie e sexo, ficando: 67,3% (348/517) fêmeas adultas (armazenadas individualmente), 22,8% (118/517) machos adultos (armazenados em “pool” de até sete exemplares) e 9,9% (51/517) ninfas (armazenadas em “pool” de até dez exemplares do mesmo animal e da mesma espécie). Utilizando-se os iniciadores ECC/ECB, ECAN/HE3 e PLATYS/HE3, verificou-se mediante PCR e Nested-PCR, frequências de 18,5% (40/216), 52,5% (21/40), 35,0% (14/40) e 20% (8/40) para agentes da Família Anaplasmataceae, *E. canis*, *A. platys* e coinfeção entre estas duas espécies, respectivamente, no DNA extraído dos cães, ficando 32,5% (13/40) das amostras negativas, para estas duas espécies pela Nested-PCR, mas diagnosticadas como *E. canis* e *A. platys* pelo sequenciamento. Ao se considerar as variáveis de sexo ( $p=0,034$ ), presença de carrapatos ( $p=0,0001$ ) e estrato socioeconômico ( $p=0,001$ ), verificou-se que houve associação entre os diferentes grupos e a infecção para agentes da Família Anaplasmataceae em cães. A análise filogenética, confirmou a presença das espécies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Ehrlichia* sp., no DNA extraído dos cães. A frequência de carrapatos positivos para agentes da Família Anaplasmataceae, mediante PCR, foi 15,0% (78/517). Entretanto, apenas duas sequências resultaram em boa qualidade para análise no GenBank, identificando o agente envolvido como *E. canis*. Além disso, dos 216 cães avaliados e 517 “pools” de carrapatos, 1,4% (3/216) e 0% (0/517) foram positivos para *Babesia* sp. na PCR utilizando os iniciadores PIRO A e PIRO B. Na RFLP demonstrou-se um padrão de clivagem, em todas as amostras, compatível com *B. vogeli*. As sequências evidenciaram um 99% de identidade para *B. vogeli*. Na avaliação de agentes rickettsiais, observou-se mediante PCR e sequenciamento, uma taxa de infecção em carrapatos de 0,2% (1/517). Essa amostra foi positiva para *gltA*, porém, negativa para *ompA*, *ompB* e *htrA*. A análise filogenética mostrou que a sequência avaliada se agrupou no clado de *R. felis*. Demonstrando pela primeira vez, mediante técnicas moleculares a presença de agentes de membros da Ordem Rickettsiales e agentes da Ordem Piroplasmida em cães, e seus carrapatos, na Província de Piura.

Palavras-chave: Anaplasmataceae, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., análise molecular, América do Sul.

## ABSTRACT

Rickettsiosis and babesiosis are important causes of morbidity and mortality in dogs and humans living in tick-infested areas. Ticks are important as vectors and reservoirs for these disease transmission agents. The aim of this work was to obtain epidemiological information regarding infections and the presence of members of the Anaplasmataceae family, and Rickettsial and piroplasmidas tick-borne agents in the metropolitan region of Piura, Peru. We performed polymerase chain reaction (PCR), nested-PCR, restriction fragment length polymorphism (RFLP), and sequencing and phylogenetic analyses in order to determine the species involved in infections and the fauna of ixodid ticks in that region. 216 blood samples and 984 ticks were collected from dogs from the region of Piura. We could identify three different tick species: 977 specimens of *Rhipicephalus sanguineus* (180 nymphs, 410 females, and 387 males), six adult females of *Amblyomma triste* and one adult male of *Amblyomma tigrinum*. The total 984 ticks were further classified morphologically by stage, species, and sex. Our data shows that from the total of ticks collected, 67.3% (348/517) were adult female ticks (stored individually), 22.8% (118/517) were adult male ticks (stored in “pools” of up to seven specimens), and 9.90% (51/517) were nymphs (stored in “pools” of 10 specimens of the same specie). The information of the dogs including sex, age presence of ticks, coexistence with other animals and socio-economic status was registered and added by the owners. DNA from blood revealed that 18.5% (40/216), 52.5% (21/40), 35.0% (14/40) and 20% (8/40) were agents of the Family Anaplasmataceae, *E. canis*, *A. Platys*, and coinfection between these two species in dogs, respectively. 32.5% (13/40) of the negative samples by Nested-PCR for these two species, were diagnosed as *E. canis* and *A. platys* by sequencing. Positive sequences detected showed 100% similarity with the species *E. canis* and *A. platys* reported in GenBank. There was a significant association between Anaplasmataceae family infection in dogs and the following variables: sex ( $P=0,034$ ), presence of ticks ( $P=0,0001$ ), and socio-economic status ( $P=0,001$ ). The frequency of positive ticks for agents of the family Anaplasmataceae, by PCR, was 15.0% (78/517). However, only two samples showed good quality sequences, and were positive for *E. Canis* by sequencing and phylogenetic analyses. Furthermore, from the 216 dogs evaluated, three (1.40%) were positive for *Babesia* sp. by PCR. All positive samples, analyzed by RFLP, revealed a cleavage compatible with *B. vogeli*. These sequences showed 99% identity with sequences of positive samples for *B. vogeli*. Not all tick samples were positively amplified by PCR with the primers PIRO A and PIRO B. During the evaluation of rickettsial agents by PCR and sequencing, the tick infection rate was 0.20% (1/517). Those samples were positive for *gltA* and negative for *ompA*, *ompB* and 17KD. The phylogenetic analysis showed that the sequence evaluated was grouped in the *R. felis* side.

Keywords: Anaplasmataceae, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., molecular analyses, South America.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.-** Ciclo biológico do carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, p.29

**Figura 2.-** Ciclo biológico do carrapato *Amblyomma americanum*, p.30

**Figura 3.-** Distribuição mundial dos vetores das bactérias da Família Anaplasmataceae em cães (Adaptado de: RYMASZEWSKA e GREYDA, 2008), p.35

**Figura 4.-** Localidades com indivíduos soropositivos para *Ehrlichia chaffeensis* reportadas no estudo de Moro et al., 2009, p.40

**Figura 5.-** Reporte anual de incidência (casos por milhão), nos diferentes estados nos Estados Unidos, para *Ehrlichia chaffeensis* em 2010, p.41

**Figura 6.-** Representação da classificação sistemática dos Protozoários da Ordem: Piroplasmida. Adaptado: VIAL e GORENFLOT, 2006, p.62

**Figura 7.-** Representação da classificação sistemática de rickettsias. Adaptado de Berg's Manual of Systematic Bacteriology, 2004 (GARRITY et al., 2004), p.74

**Figura 8.-** Distribuição geográfica aproximada da Febre Maculosa no continente americano. As áreas sombreadas mostram as regiões onde a Febre Maculosa é endêmica. (Adaptado de: Dantas-Torres, 2007), p.76

**Figura 9.-** Crescimento populacional no Departamento de Piura - Peru. Fontes: Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) , p.88

**Figura 10.-** Localização geográfica do Peru, e do Departamento de Piura na América do Sul (A). Localização geográfica dos distritos (letras verdes), das oito províncias (letras vermelhas) do Departamento de Piura (B). Fonte: Instituto Geograficodel Nacional (IGN), p.90

**Figura 11.-** Localização dos diferentes bairros nos Distritos de Piura e Castilla onde foram coletadas as amostras. Fonte: Sistema de Informacón Geográfica para Emprendedores (SIGE), p.91

**Figura 12.** Resultados da frequência da infecção para agentes da Família Anaplasmataceae, mediante PCR, em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru, de acordo com Estrato Socioeconômico, p.110

**Figura 13.** Árvore filogenética baseada na seqüência parcial da porção 16S do gene rRNA de amostras positivas para ECC/ECB, ECAN/HE3 e PLATYS/HE3, na região metropolitana da província de Piura-Peru, p.113

**Figura 14.** Eletroforese em gel agarose a 1,5% obtendo resultado da digestão realizada por enzimas de restrição evidenciando fragmentos amplificados dos cães positivos na primeira PCR, para piroplasmas, p.116

**Figura 15.** Árvore filogenética baseada na seqüência parcial da porção 18S do gene rRNA de amostras positivas para *B. vogeli*, na região metropolitana da província de Piura-Peru, p.116

**Figura 16.** Árvore filogenética baseada na seqüência parcial do gene *gltA* da amostra positivas para *R. felis*, na região metropolitana da província de Piura-Peru, p.120

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Resumo das mudanças taxonômicas nos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, segundo Rymaszewska e Grenda (2008). Letras A, B, B2, B3, B4, B5, B6, B7, C, indicam uma mudança na posição sistemática, p.21

**Quadro 2.** Carrapatos conhecidos ou suspeitos de serem vetores na transmissão de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em cães., p.28

**Quadro 3.** Espécies do gênero *Anaplasma*, espectro de hospedeiros, vetores, doença produzida, e células infectadas (Adaptado de: RYMASZEWSKA e GREENDA, 2008), p.31

**Quadro 4.** Distribuição geográfica *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia. risticii*, p.38

**Quadro 5.** Prevalência de *Ehrlichia canis* na América do Sul, p.39

**Quadro 6.** Distribuição geográfica dos agentes causadores de piroplasmose canina, p. 63

**Quadro 7.** Prevalências de espécies de piroplasma em cães domésticos na América do Sul, p.65

**Quadro 8.** Riquetsioses patogênicas do GFM no Mundo, p.76

**Quadro 9.** Médias máximas e mínimas dos Parâmetros Climáticos (Temperatura e precipitação) no Departamento de Piura, p.89

**Quadro 10.** Níveis Sócio Econômico dos principais bairros dos Distritos de Piura e Castilla, da Província de Piura, Piura-Peru, p.92

**Quadro 11.** Iniciadores utilizados na amplificação de fragmento de aproximadamente 399pb do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase GAPDH F/GAPDH R, presente em todos os mamíferos, p.95

**Quadro 12.** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para GAPDH F/GAPDH R, a partir de amostras de sangue (Adaptado de: BIRKENHEUER et al., 2003), p.95

**Quadro 13.** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para o gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a partir de amostras de sangue (Adaptado de: BIRKENHEUER et al., 2003), p.96

**Quadro 14.** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para ECB/ECC, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: DAWSON et al., 1994, 1996), p.96

**Quadro 15.** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para ECC/ECB, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: DAWSON et al., 1994, 1996), p.97

**Quadro 16.** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para ECAN/HE3 e PLATYS/HE3 , a partir do produto do primeiro round (Adaptado de: DAWSON et al., 1996; MURPHY et al., 1998; BROWN et al, 2001), p.97

**Quadro 17.** Temperaturas e tempos das fases usadas na Nested PCR, para ECAN/HE3 e PLATYS e HE3, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: DAWSON et al., 1996; MURPHY et al., 1998; BROWN et al, 2001), p.98

**Quadro 18.** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação dos genes ompA; ompB e gltA, a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994), p.98

**Quadro 19.** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação dos genes ompA; ompB e gltA, a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994), p.99

**Quadro 20.**Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação do gene 17KD a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: LABRUNA et al., 2004), p.99

**Quadro 21.** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação do gene 17KD a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: LABRUNA et al., 2004), p.99

**Quadro 22.** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para PIRO A/PIRO B, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: CARRET et al., 1999), p.100

**Quadro 23.** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, PIRO A/PIRO B, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: CARRET et al., 1999), p.100

**Quadro 24.** Resultados esperados dos tamanhos de fragmentos de DNA (pb) na PCR e restrição enzimática para cada espécie de piroplasma, p.101

**Quadro 25.** Iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR para a detecção de agentes de membros Ordem Rickettsiales e agentes da Ordem Piroplasmida, p.105

## LISTA DE TABLAS

**Tabela 1.** Resultados da PCR e sequenciamento para agentes da Família Anaplasmataceae em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru, 2017, p.178

**Tabela 2.** Frequências absolutas e relativas de infecção por agentes da Família Anaplasmataceae, mediante PCR, segundo as variáveis de sexo, faixa etária, convivência com outros animais, estrato socioeconômico e presença de carrapatos em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru, 2017, p.110

**Tabela 3.** Frequências absolutas e relativas de infecção para agentes da Família Anaplasmataceae, mediante PCR, segundo os bairros e estrato socioeconômico em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura, Piura-Peru, 2017, p.111

**Tabela 4.** Resultados da PCR e sequenciamento para agentes da Família Anaplasmataceae em carrapatos de cães provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru, 2017, p.179

## SUMÁRIO

- 1. INTRODUÇÃO**, p.17
- 2. REVISÃO DE LITERATURA**, p.19
  - 2.1 FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE, p.19
    - 2.1.1 Taxonomia**, p.19
      - 2.1.1.1 Nova classificação, p.19
      - 2.1.1.2 histórico, p. 20
    - 2.1.2 Microorganismos da Ordem rickettsiales**, p.23
    - 2.1.3 Propriedades, características genéticas e antigênicas dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma***, p.24
    - 2.1.4 Ciclos biológicos**, p.26
      - 2.1.4.1 Ciclo biológico de *Ehrlichia canis*, p.26
      - 2.1.4.2 Ciclo biológico da *Ehrlichia chaffeensis*, p.28
      - 2.1.4.3 Ciclo biológico *Anaplasma platys*, p.29
    - 2.1.5 Epidemiologia**, p.31
      - 2.1.5.1 Carrapatos, p.31
        - 2.1.5.1.1 Biologia, p.31
        - 2.1.5.1.2 Distribuição, p.31
      - 2.1.5.2 Fatores importantes na ocorrência da doença em humanos e animais, p.34
        - 2.1.5.2.1 Fatores inerentes ao vetor, p.34
        - 2.1.5.2.2 Fatores Climáticos, p.35
        - 2.1.5.2.3 Fatores Socioeconômicos e culturais, p.35
        - 2.1.5.2.4 Fatores de Delineamento, p.36
      - 2.1.5.3 Presença, frequência e distribuição geográfica da Erliquiose e Anaplasmosse canina, p.36
    - 2.1.6 Imunopatogenia**, p.41
      - 2.1.6.1 Imunopatogenia *Ehrlichia canis*, p.41
        - 2.1.6.1.1 fase aguda, p.42
        - 2.1.6.1.2 Fase sub-clínica, p.46
        - 2.1.6.1.3 Fase Crônica, p.47
      - 2.1.6.2 Imunopatogenia *Ehrlichia chaffeensis*, p.47
      - 2.1.6.3 Imunopatogenia *Anaplasma platys*, p.50
    - 2.1.7 Patologia clínica**, p.51

2.1.7.1 Alterações Hematológicas nas infecções por <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> , p.52	
2.1.7.2 Alterações bioquímicas nas infecções por <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> , p.54	
<b>2.1.8 Diagnóstico laboratorial</b> , p.56	
2.1.8.1 Microscopia Óptica, p.56	
2.1.8.2 Sorologia, p.57	
2.1.8.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta, p.57	
2.1.8.2.2 Testes comerciais de Ensaio Imunoenzimático Indireto, p.57	
2.1.8.3 Diagnóstico Molecular, p.58	
<b>2.2 PIROPLASMOSE EM CÃES</b> , p.59	
<b>2.2.1 Etiologia da piroplasmose em cães</b> , p.59	
<b>2.2.2 Taxonomia</b> , p.61	
<b>2.2.3 Ciclo biológico</b> , p.61	
<b>2.2.4 Epidemiologia da piroplasmose em cães</b> , p.62	
<b>2.2.5 Imunopatogenia piroplasmose em cães</b> , p.66	
<b>2.2.6 Achados clínicos e laboratoriais da piroplasmose em cães</b> , p.68	
<b>2.2.7 Diagnóstico laboratorial</b> , p.70	
<b>2.3 RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA</b> , p.72	
<b>2.3.1 Taxonomia, propriedades, características genéticas e antigênicas dos microorganismos da Ordem Rickettsiales</b> , p.72	
<b>2.3.2 Epidemiologia</b> , p.74	
<b>2.3.3 Rickettsias do grupo da Febre Maculosa em carrapatos</b> , p.78	
<b>2.3.4 Imunopatogenia</b> , p.80	
<b>2.3.5 Achados clínicos e laboratoriais nas rickettsioses</b> , p.81	
<b>2.3.6 Diagnóstico laboratorial</b> , p.83	
<b>3 OBJETIVOS</b> , p.85	
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> , p.86	
4.1 AUTORIZAÇÃO, p.86	
4.2 DELINEAMENTO DO PROJETO, p.86	
4.2.1 Escolha da Espécie e lugar, p.86	
4.2.2 Tamanho da amostra, p.86	
4.2.3 Descrição geográfica da área de Estudo, p.87	
4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS, p.99	
4.3.1 Coleta do Sangue, p.90	
4.3.2 Coleta dos Carrapatos, p.91	

4.4	TRANSPORTE DO MATERIAL,	p.91
4.5	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRA,	p.92
<b>4.5.1</b>	<b>Extração do DNA,</b>	p. 92
4.5.1.1	Extração do DNA do sangue,	p.92
4.5.1.2	Extração do DNA dos carrapatos,	p.92
<b>4.5.2</b>	<b>Identificação Morfológica de Ixodídeos,</b>	p.93
<b>4.5.3</b>	<b>Reação em Cadeia da polimerase (PCR),</b>	p.93
4.5.3.1	Controles,	p. 93
4.5.3.2	Amplificação de agentes da família Anaplasmataceae,	p.95
4.5.3.3	PCR e nested-PCR para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Anaplasma platys</i> ,	p.96
4.5.3.4	PCR para Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa,	p.97
4.5.3.5	PCR para detecção de Piroplasmas,	p.99
4.5.3.6	Restrição Enzimática,	p.100
<b>4.5.4</b>	<b>Cuidados gerais,</b>	p.101
<b>4.5.5</b>	<b>Visualização dos produtos de amplificação,</b>	p.101
<b>4.5.6</b>	<b>Purificação,</b>	p.101
4.5.7	Reação de Sequenciamento,	p.101
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICO,	p.102
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSSAO,</b>	p.104
5.1	CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA DOS CARRAPATOS,	p.104
5.2	FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE ,	p.105
<b>5.2.1</b>	<b>Amostras do sangue,</b>	p.105
<b>5.2.2</b>	<b>Amostras dos Carrapatos,</b>	p.114
5.3	ORDEM PIROPLASMIDA,	p.118
5.4	RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA,	p.122
<b>6</b>	<b>CONLUSOES,</b>	p.126
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA,</b>	p.127
	<b>APÊNDICES,</b>	p.169
	<b>Apêndice 1.</b> Instrução Normativa Interministerial,	p.169
	<b>ANEXOS,</b>	p.178
	<b>Anexo 1.</b> Autorização do Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (CEPA),	p.178
	<b>Anexo 2.</b> Termo Consentimento Livre e Esclarecido,	p.179
	<b>Anexo 3.</b> Ficha de identificação dos animais,	p.181



## 1. INTRODUÇÃO

As zoonoses transmitidas por carrapatos representam uma séria ameaça para a saúde e o bem-estar tanto na saúde pública como na saúde animal. Todas as espécies de carrapatos requerem, obrigatoriamente, sangue de vertebrados e possuem significativo grau de especificidade podendo utilizar hospedeiros alternativos, incluindo o homem. Durante o processo de alimentação, os carrapatos podem transmitir microrganismos patogênicos juntamente com a saliva. Diversos gêneros e espécies de bactérias, vírus e protozoários mantêm ciclos zoonóticos na natureza utilizando como vetores, os carrapatos. É por isso, que os carrapatos são considerados um dos grupos mais importantes de vetores para doenças infecciosas emergentes e reemergentes em humanos, animais domésticos e selvagens (JONGEAN e UILENBERG, 2004).

O conhecimento da epidemiologia de uma enfermidade consiste em determinar as condições socioeconômicas da população, a distribuição e densidade dos vetores já incriminados como transmissores, assim como as condições ecológicas das localidades. Além disso, observar a dinâmica populacional desses vetores, possibilitando a definição do momento adequado de intervenção visando a quebra do ciclo parasitário, quando já instalado (LEMOS et al., 1996a).

As febre rickettsioses, e a babesiose são zoonoses reemergentes que chegam a causar, aproximadamente, 80% de letalidade. A importância destas doenças, transmitidas por carrapatos, constitui-se no fato de mimetizarem um grande número de doenças infecciosas e parasitárias, o que dificulta o diagnóstico específico e, conseqüentemente, o tratamento (JONGEAN e UILENBERG, 2004).

Diversos estudos relataram a presença de vários gêneros de carrapatos em distintas regiões do Peru, tal como Piura, encontrando-se os gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, tanto no cão como em outros hospedeiros. Além disso, é importante

ressaltar que nessas regiões existe a evidência sorológica, tanto em humanos como em cães, para a doença de Lyme, febre maculosa e ehrlichiose, mediante o teste de ELISA IgG/IgM (GLENNY et al., 2004; SAN MIGUEL, 2006). Entretanto, a ocorrência de alguns dos agentes etiológicos que causam estas doenças ainda não foi reportada no Peru por técnicas moleculares.

Por outro lado, os progressos nas técnicas laboratoriais para o estudo de diferentes agentes, principalmente com o uso da Biologia Molecular, vêm possibilitando a identificação de novas espécies em todo o mundo de espécies patogênicas já conhecidas, tanto em cães como em triturados brutos de carrapatos, em áreas ou continentes nunca reportados anteriormente ( EREMEEVA et al., 1994; BILLINGS et al., 1998; BLAIR et al., 2004; FORSHEY et al., 2010).

Devido à importância clínica destes agentes, a grande população de vetores transmissores de hemoparasitos e por muitas destas parasitoses possuírem potencial zoonótico, torna-se necessária a caracterização dos agentes presentes na região norte do território Peruano, para que sejam traçadas estratégias de controle e métodos de diagnóstico eficientes, e assim, um maior conhecimento das características epidemiológicas da infecção de cães por membros da Ordem Rickettsiales e da Ordem Piroplasmida.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivos verificar a presença de membros da Família Anaplasmataceae, de Rickettsias do grupo da Febre Maculosa (RGFM) e agentes da Ordem Piroplasmida, que acometem cães (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) assim como a de seus carrapatos (Acari-, Ixodidae) vetores, na região Metropolitana da Província de Piura, no Departamento de Piura-Peru, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), polimorfismos de restrição de fragmentos amplificados (RFLP), Sequenciamento e Análise filogenética, determinar as espécies envolvidas nas infecções, assim como conhecer a fauna de Ixodídeos nessa região.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE

#### 2.1.1 Taxonomia

##### 2.1.1.1 NOVA CLASSIFICAÇÃO

Acompanhando a tendência estabelecida com divisão em genogrupos, os gêneros da Família Anaplasmataceae foram submetidos a uma importante reclassificação. Dumler et al. em 2001, após estudos das sequências dos genes codificadores da unidade 16S RNAr, da gênese de proteínas de superfície e análise genética da proteína de choque térmico GroEL, forneceram evidências moleculares da necessidade de uma reestruturação das famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae. Os resultados desse trabalho indicaram que a Ordem Rickettsiales inclui as Famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae. Por um lado, a Família Rickettsiaceae abrange os gêneros *Rickettsia* spp e *Orientia* spp. os quais são de grande importância em saúde pública por serem agentes causais de importantes zoonoses.

Os membros das tribos Ehrlichiaee e Wolbachiaee foram transferidos para a família Anaplasmataceae com a eliminação da estrutura tribal da família Rickettsiaceae, ficando dividida em quatro importantes genogrupos. Genogrupo N° 1 : *Ehrlichia canis* (espécie tipo), Genogrupo N° 2 : *Anaplasma*, Genogrupo N° 3 : *Neorickettsia helminthoeca* (espécie tipo) e Genogrupo N° 4 : *Wolbachia pipientis*.

No primeiro Genogrupo foi incluída a espécie *E. ruminantium*, antiga *Cowdria ruminantium*. No segundo passou então a incluir as espécies *A. platys* (antiga *E. platys*), *A. phagocytophilum* (junção entre *E. equi* e *E. phagocytophila*), *A. bovis* (antiga *E. bovis*). Já no terceiro genogrupo, foram incluídas as espécies *N. risticii*, antiga *E. risticii*, reportada desde inícios da década de 1980 nos Estados Unidos e Canadá (WALKER e DUMLER, 1996) e *N. sennetsu*, inicialmente denominada de *Rickettsia sennetsu*. Estas alterações foram

homologadas em 2002, com *A. phagocytophila* tendo seu nome corrigido para *A. phagocytophilum*, *A. bovis* e *A. platys*. Assim, o gênero *Anaplasma* passou então a incluir a espécie *A. platys* (antiga *E. platys*), *A. phagocytophilum* e *A. bovis* (antiga *E. bovis*) (Quadro 1).

**Quadro 1.** Resumo das mudanças taxonômicas nos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, segundo Rymaszewska e Grenda (2008). Letras A, B, B2, B3, B4, B5, B6, B7, C, indicam uma mudança na posição sistemática.

Taxonomia dos gêneros <i>Ehrlichia</i> e <i>Anaplasma</i> antes e depois de 2001	
Taxonomia antes de 2001	Taxonomia depois de 2001
Classe $\alpha$ -proteobacteria	Classe $\alpha$ -proteobacteria
Ordem II Rickettsiales	Ordem II Rickettsiales
Família I Rickettsiaceae	Família I Rickettsiaceae
Gênero I <i>Rickettsia</i>	Gênero I <i>Rickettsia</i>
Gênero II <i>Orientia</i>	Gênero II <i>Orientia</i>
Gênero III <i>Wolbachia</i> – A	Família II. Anaplasmataceae
Família II Ehrlichiaeae	Gênero I <i>Anaplasma</i> Especies
Gênero I <i>Ehrlichia</i> – B Especies	<i>A. marginale</i>
<i>E. canis</i> – B2	<i>A. centrale</i>
<i>E. chaffeensis</i> – B3	<i>A. phagocytophilum</i> – B4
<i>E. equi</i> – B4	<i>A. platys</i> – B5
<i>E. phagocytophila</i> – B4	Gênero IV <i>Ehrlichia</i> – B Especies
<i>czynnik HGE</i> – B4	<i>E. canis</i> – B2
<i>E. platys</i> – B5	<i>E. chaffeensis</i> – B3
<i>E. risticii</i> – B6	<i>E. ruminantium</i> – C
<i>E. sennetsu</i> – B7	Gênero V <i>Neorickettsia</i> Especies
Gênero III <i>Anaplasma</i> Especies	<i>N. helminthoeca</i>
<i>A. marginale</i>	<i>N. risticii</i> – B6
<i>A. centrale</i>	<i>N. sennetsu</i> – B7
Gênero IV <i>Cowdria</i> Especie	Gênero VI <i>Wolbachia</i> – A
<i>C. ruminantium</i> – C	
Gênero V <i>Neorickettsia</i>	
<i>N. helminthoeca</i>	

### 2.1.1.2 HISTÓRICO:

Bactérias da família Anaplasmataceae foram, por muito tempo, consideradas importantes somente na Medicina Veterinária, entretanto, algumas espécies foram, recentemente, relatadas como sendo zoonoses e, portanto, de importância na saúde pública.

A erliquiose é uma das mais importantes hemoparasitoses que acometem cães (*Canis familiaris*), causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, sendo a principal espécie *Ehrlichia canis*.

No ano de 1925 foi descrito o agente infeccioso *Cowdria ruminantium* (atualmente *Ehrlichia ruminantium*) em bovinos que apresentavam problemas cardíacos (DUMLER et al., 2001). Posteriormente, no Instituto Pasteur na Argélia, Donatien e Lestoquard no ano de 1935 identificaram micro-organismos dentro de monócitos de cães, provenientes de animais que apresentavam quadros de anemia e febre e com antecedentes de infestação por carrapatos. O agente infeccioso foi nomeado inicialmente como *Rickettsia canis*, e classificado em 1945 como *Ehrlichia canis*, levando o nome do gênero *Ehrlichia* em honra ao microbiologista alemão Paul Ehrlich (MOSHKOVSKI, 1945). Durante a década de 1940, reportaram-se casos de erliquiose canina em diferentes países do centro e sul do continente Africano, assim como na Índia (RIKIHISA, 1991).

Nas décadas de 1960 e 70, *E. canis* ganhou notoriedade ao causar centenas de mortes em cães militares norte-americanos durante a guerra do Vietnã (HUXSOLL et al., 1969). A ehrlichiose canina, já recebeu diversos nomes, como rickettsiose canina, tifo canino, febre hemorrágica canina, síndrome hemorrágica idiopática e pancitopenia tropical canina, sendo o último o mais aceito. Após o aparecimento desses surtos epizooticos em cães das forças armadas os pesquisadores intensificaram a sua atenção, conseguindo realizar o cultivo de *E. canis* (NYINDO et al., 1971).

Atualmente a Erliquiose Monocítica Canina (*E. canis*) é reportada quase no mundo inteiro, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, causando elevada morbidade e mortalidade. Em função da observação da presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em quase todo o planeta imagina-se que a doença esteja amplamente distribuída. (BORIN et al., 2009)

Na Flórida, Estados Unidos, em 1978, um microrganismo específico de plaquetas foi isolado de um cão que apresentava alterações hematológicas. O agente foi isolado e transmitido experimentalmente para cães adultos que foram infectados por inoculação intravenosa de sangue. Parasitemias e trombocitopenias concomitantes recorreram de forma cíclica em períodos relativamente constantes de uma a duas semanas seguintes das infecções experimentais. A partir desse primeiro relato *Anaplasma platys* foi reconhecida como o agente

causal da Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC) (HARVEY et al., 1978). O agente vem sendo descrito em diversas partes do mundo, com alta incidência em regiões tropicais e subtropicais como América do Sul (SUKSAWAT et al., 2001; ABARCA et al., 2007).

*Ehrlichia risticii* foi descrita pela primeira vez por Holland et al., (1985). O primeiro relato da infecção, entretanto, foi feito em 1979, em cavalos da região de Maryland, Estados Unidos, próximo às pastagens ao longo do Rio Potomac (HOLLAND et al., 1985). Com base em estudos moleculares *E. risticii* foi transferida para o gênero *Neorickettsia* (DUMLER, 2001)

Em 1987, *Ehrlichia chaffeensis* foi identificada como organismo causador da erliquiose monocítica humana. Através do sequenciamento do gene 16S rRNA, verificou-se homologia de 98,2% entre a *E. canis* e a *E. chaffeensis* (ANDERSON et al., 1991). *Ehrlichia chaffeensis* pode, também, infectar naturalmente o cão (MURPHY et al., 1998). *Ehrlichia chaffeensis* parasita mononucleares sanguíneos de seres humanos e é geneticamente semelhante à *E. canis* apresentando mórulas semelhantes e reação cruzada de anticorpos (DAWSON et al., 1991; DAGNONE et al., 2001).

As descobertas da Erliquiose Granulocítica Humana (EGH), de *E. sennetsu* (“febre sennetsu humana”) e o isolamento da *E. chaffeensis* em seres humanos, apontaram que a erliquiose é de grande importância, tanto na Medicina Veterinária como na saúde pública (McDADE, 1989; ANDERSON et al., 1991; RIKIHISA, 1991; ANDERSON et al., 1993; BAKKEN et al., 1994; CHEN et al., 1994; FISHBEIN et al., 1994).

Os primeiros casos de infecção humana por *E. chaffeensis* foram relatados nos Estados Unidos em 1994 (CHEN et al., 1994; BAKKEN et al., 1994). A doença, que em alguns pacientes foi letal, recebeu o nome de Erliquiose Granulocítica Humana (EGH). Chen et al. (1994) sequenciaram o gene de 16S RNA de *E. chaffeensis* e constataram que ele possuía uma semelhança de 99,9% com o gene homólogo de *E. phagocytophila*, mostrando a possibilidade de que estas duas espécies fossem as mesmas. Poucos anos depois, em 1997, na Europa, foram notificados os primeiros casos de EGH. A partir de amostras de pacientes procedentes de uma zona endêmica para Doença de Lyme, na Eslovênia, identificou-se o mesmo agente descrito por Chen e colaboradores três anos antes (PETROVEC et al., 1997).

Em 1984, Ristic e Huxsoll elaboraram uma classificação do gênero *Ehrlichia* baseando-se na comparação de características fenotípicas, envolvendo as interações da *Rickettsia* em questão com o meio ambiente (ecologia, dados epidemiológicos e padrões de infecções experimentais e em humanos). Ao longo do tempo, essa classificação foi revisada com o aumento de novas espécies, mas sem que fossem feitas mudanças no sistema de classificação (RIKIHISA, 1991). Entretanto, com o uso de novas ferramentas de biologia molecular, principalmente, no sequenciamento de regiões específicas do gene 16S do RNA ribossomal e estudos diversos relacionados ao DNA, foi possível reorganizar os membros da família Anaplasmataceae em quatro importantes genogrupos (DUMLER et al., 2001).

Além disso, a caracterização molecular das sequências do gene que codificam a gp36 de *E. canis*, de isolados obtidos de diferentes regiões do mundo, mostraram completa conservação de repetições de sequências nucleotídicas (HECHEMY et al., 2005). Diversos estudos, mediante o uso da análise filogenética apontando regiões específicas do gene 16S do RNA ribossomal, mostraram uma baixa variedade genética sugerindo uma provável evolução lenta e homogênea nos diferentes isolados de *E. canis* (SIARKOU et al., 2007; VINASCO et al., 2007; PINYOOWONG et al., 2008) e *A. platys* (PINYOOWONG et al., 2008).

Cardoso et al. (2007) mostraram uma alta similaridade de sequências obtidas no Brasil com outras amostras de regiões geográficas distintas na América do Sul sugerindo que circulam pelo menos três linhagens diferentes de *A. platys*.

### **2.1.2 MICROORGANISMOS DA ORDEM RICKETTSIALES**

Todos os membros da família Anaplasmataceae são bactérias intracelulares obrigatórias, as quais se replicam dentro dos vacúolos intracitoplasmáticos, derivados da membrana externa da célula hospedeira eucariótica. Estes microrganismos podem se apresentar na forma de bacilo, cocos e/ou pleomórfica, apresentando paredes celulares típicas de bactérias gram-negativas sem flagelos (RIKIHISA, 2007). As formas de bacilo são curtas, enquanto as cocóides podem se apresentar individualmente, como diplococos, em cadeias curtas ou em filamentos (RIKIHISA, 2015). Estas bactérias tendem a ser muito pequenas, tendo um diâmetro de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  e um comprimento entre 0,8 e 2,0  $\mu\text{m}$  (PRESCOTT et al., 1999; ZHANG et al., 2007). A forma mais característica é a de colônia, ou mórula. Quando corados, estes agentes são de fácil visualização através da microscopia óptica. Com a

coloração de Giemsa elas se coram de azul e na coloração de Macchiavello se coram vermelho em contraste com o citoplasma manchado azul em torno delas (CARTER, 1985; RIKIHISA, 2015).

Todas rickettsias são microorganismos parasitas ou mutualistas. As formas parasitárias podem crescer em vários tipos de células (eritrócitos de vertebrados, células retículo endoteliais e células endoteliais vasculares), habitam também em artrópodes que se alimentam de sangue, tais como pulgas, carrapatos, ácaros ou piolhos, que atuam como vetores ou hospedeiros primários (ZHANG et al., 2007; RIKIHISA, 2010).

Os agentes rickettsiais perdem a sua atividade biológica quando armazenados a 0 ° C ou incubados durante algumas horas a 36 ° C. Eles crescem em diferentes partes da célula (núcleo ou citoplasma). Tem sido sugerido que rickettsias crescem melhor quando o metabolismo da célula hospedeira é baixo. Em geral, eles são rapidamente destruídos pelo calor, secagem e produtos químicos bactericidas (BROOKS et al., 1999).

### **2.1.3 Propriedades, características genéticas e antigênicas dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*.**

As características fenotípicas dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* são muito semelhantes, diferindo principalmente na sua gama de hospedeiros e células que colonizam. Estes organismos são aeróbios e não crescem em meios bacteriológicos padrões (VADILLO et al., 2002). Elas se reproduzem por divisão binária como a maioria das bactérias (SAINZ et al., 2000). Os microrganismos do gênero *Ehrlichia* são pequenos, cocóides ou pleomórficos e se reúnem em forma de mórula de coloração basofílica (cor azul ou roxa) nas colorações do tipo Romanowsky (como a coloração de Wright) (POPOV et al., 1998; RIKIHISA, 2015).

As bactérias são encontradas em vacúolos (fagossomos), principalmente em células hematopoiéticas. *Ehrlichia canis*, *E. muris* e *E. chaffeensis* são comumente detectadas em monócitos e macrófagos. A espécie *E. ruminantium* é frequentemente encontrada em células endoteliais, neutrófilos e macrófagos de ruminantes, bubalinos e bovinos. *Ehrlichia ewingii* geralmente infecta neutrófilos (RIKIHISA, 1991; DUMLER et al., 2001; RYMASZEWSKA e GRENDA, 2008). Uma das mais importantes características patogênicas é a seleção das células mielocíticas como células alvo (VADILLO et al., 2002).

As rickettsias são muito diferentes da maioria das bactérias em sua fisiologia e metabolismo. Elas não têm a via glicolítica e não usam a glicose como fonte de energia, mas



oxidam glutamato e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, como o succinato. A membrana citoplasmática destes microrganismos tem um sistema de transporte mediado por transportadores, e nutrientes e co-enzimas da célula hospedeira são absorvidos e utilizados diretamente. Estes microrganismos capturam NAD e glucose-uridina difosfato, e também trocam ADP por ATP com a célula hospedeira de tal modo que a célula hospedeira proporciona a maior parte da energia necessária para o crescimento intracelular da *Ehrlichia* (PRESCOTT et al., 1999; ZHU et al., 2009; RIKIHISA, 2010; RIKIHISA, 2011).

Seu desenvolvimento inclui três estágios: corpúsculo elementar, corpúsculo inicial e mórula. Os corpúsculos iniciais, inclusões pleomórficas, são formados a partir do crescimento e multiplicação dos corpúsculos elementares dentro do fagossoma, através da divisão binária, entre o 3° e 5° dia de infecção (NYINDO et al., 1971; LOSOS, 1986; THOMAS et al., 2009). Estes, são revestidos por uma membrana externa fina e uma membrana interior. Alguns membros do gênero *Rickettsia* e membros do gênero *Ehrlichia* têm membrana externa muito fina (RIKIHISA, 2009).

As proteínas tio-dissulfeto oxidoredutases são proteínas relacionadas com as pontes dissulfeto e foram, recentemente, identificadas em *E. canis* e *E. chaffeensis*. Aparentemente, estas possuem um papel importante no ciclo de vida e patogênese da doença, uma vez que desempenham um papel fundamental no transporte intramolecular no interior dos corpos Ehrlichiais (MCBRIDE et al., 2002). Estas mesmas proteínas têm sido observadas em *Anaplasma marginale* (VIDOTTO et al., 1994).

O genoma de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. é pequeno, de aproximadamente 1.3 Mb. O genoma de *A. phagocytophilum* é de 1,4 Mb., *E. chaffeensis* 1,2 Mb. E *Neorickettsia sennetsu* (*Ehrlichia sennetsu*) 0,9 Mb, tendo sido determinados por técnicas eletroforéticas (DUMLER et al., 2001; FRUTOS et al., 2006, DUNNING., et al 2006). O genoma de *Ehrlichia canis* é uma molécula circular de 1,3 Mb tendo porcentagem aproximada de G + C de 30 % (FRUTOS et al., 2006). O genoma de *E. canis* tem um total de 984 genes, incluindo uma cópia dos genes de cada rRNA (5S, 16S e 23S). Estes genes ribossomais não se encontram em conjunto no mesmo operon, o gene de rRNA 16S é separado dos outros dois genes ribossomais, isto também tem sido observado nos genomas do gênero *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Wolbachia* (MAVROMATIS et al., 2006).

Dentro das sequências de nucleotídeos caracterizados para estes organismos estão o gene de rRNA 16S (ANDERSON et al., 1991), genes que codificam proteínas

imunorreactivas (SUMNER et al.,1999), genes de proteínas de 120 kDa (YU et al., 1997), 106 kDa e 37 kDa, genes de proteínas de choque térmico GroEL (SUMNER et al., 1997), gene da quinolato sintetase e um locus contendo 22 genes homólogos, mas não idênticos (YU et al., 2000; OHASHI et al., 2001). Todas estas sequências de nucleotídeos concedem à bactéria a capacidade de variar genética, antigênica e fenotipicamente na célula hospedeira e, assim, evitar o sistema imune (RIKIHISA et al., 2009).

Estudos realizados por Miura e Rikihisa (2007) revelaram que existem diferentes fenótipos de virulência entre as diversas cepas de *E. chaffeensis*, apresentando-se um quadro clínico diferente cada vez que uma cepa distinta infecta um animal devido a diferentes potenciais de virulência. Os autores, nestes estudos, realizaram a inoculação de 3 diferentes amostras (Arkansas, Wakulla e Liberty), isoladas em condados da Flórida, EUA, em ratos imunossuprimidos, encontrando que a ordem das cepas por carga bacteriana detectada nos ratos e gravidade dos sinais clínicos era Wakulla, Liberty e por último Arkansas.

A caracterização molecular de *E. canis* tem identificado o conjunto das principais proteínas imunorreativas, incluindo glicoproteínas e uma grande família de proteínas da membrana externa: três glicoproteínas foram identificados em *E. canis* (gp36, gp 200 e gp L40 ) com ortólogos correspondente ao patógeno humano, *E. chaffeensis* (PADDOCK e CHILDS, 2003). Estas glicoproteínas estão entre as primeiras proteínas descritas em bactérias patogênicas e parecem ser importantes alvos da resposta imunológica do hospedeiro, atuam no ataque a célula hospedeira ou exercem outras funções potencialmente significativas na patologia da infecção (MOUMÈNE e MEYER, 2016).

Além disso, os genes de um sistema de secreção de tipo IV foram identificados em *E. canis* (Vitb e VirD). As Proteínas Vir desempenham um papel chave nas relações do patógeno com a célula hospedeira, interagindo com proteínas de secreção e de inibição da inclusão de bactérias para os lisossomas, entre elas a proteína VirB9, expressa pelas bactérias tanto em células de mamíferos quanto em células de carrapatos (OHASHI et al., 2001; LIU et al., 2012)

## **2.1.4 CICLOS BIOLÓGICOS**

### **2.1.4.1 Ciclo biológico de *Ehrlichia canis*:**

A Erliquiose causada por *E. canis* e *E. chaffeensis* tem semelhanças no que diz respeito aos ciclos biológicos, assim como a transmissão por carrapatos (Quadro 2), e hospedeiros mamíferos (silvestres e domésticos) e afetar o homem, considerando que *E.*

*chaffeensis* é um patógeno que afeta principalmente humanos (entre outras espécies) e *E. canis* afeta principalmente canídeos (domésticos e selvagens) e em menor extensão o humano (RIKIHISA, 2011).

**Quadro 2.** Carrapatos conhecidos ou suspeitos de serem vetores na transmissão de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em cães.

<b>Agente</b>	<b>Vetor</b>
<i>E. canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>E. chaffeensis</i>	<i>Amblyomma americanum, Dermacentor variabli</i>
<i>E. ewingii</i>	<i>A. americanum, Otobius megnini,</i>
<i>E. equi</i>	<i>Ixodes pacificus</i>
<i>A. phagocytophila</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>A. platys</i>	<i>R. sanguineus?</i>

Adaptado de: NEER et al., 2002

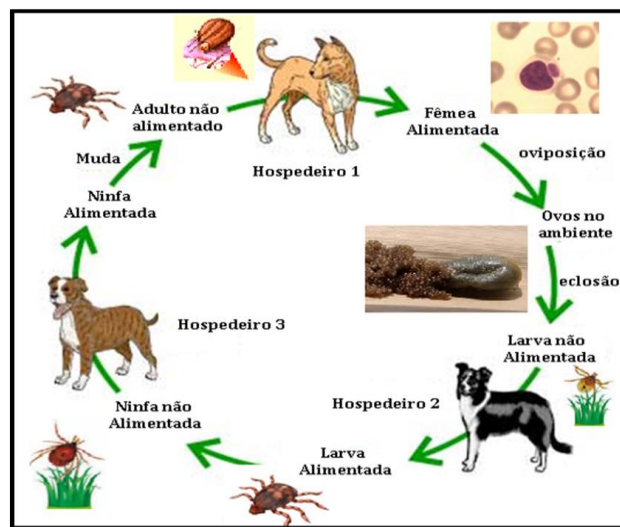
O ciclo biológico de *E. canis* está resumido na Figura 1, usando como base o ciclo biológico de *R. sanguineus*, que é transmissor desta bactéria intracelular e o seu desenvolvimento requer três hospedeiros. No carrapato, *E. canis* se espalha a partir das glândulas salivares até o intestino. Ao se alimentar, esses carrapatos injetam as secreções das glândulas salivares infectados com *E. canis* (STICH et al., 2008).

Todo o ciclo da infecção, desde a invasão da *Ehrlichia* na célula hospedeira até a sua eliminação, leva um período de, aproximadamente, 12 e 18 dias (WEISS e DASCH, 1981). O ciclo da *Ehrlichia* é constituído de três fases principais: (1) penetração dos corpos elementares (0,5 – 0,9  $\mu\text{m}$ ) nos monócitos, onde se dividem por fissão binária e permanecem em crescimento por aproximadamente 2 dias; (2) multiplicação do agente, por um período de 3 a 5 dias, com a formação do corpo inicial (1,5 – 2,5  $\mu\text{m}$ ); e (3) formação das mórulas (4-5  $\mu\text{m}$ ), sendo estas constituídas até por mais de 40 corpos elementares envoltos por uma membrana (DAVOUST, 1993; GREGORY, 1990; POPOV et al., 1998; SAINZ et al., 2000).

Os três estádios do carrapato vetor (larva, ninfa e adulto), são capazes de transmitir o agente. Têm sido demonstrado que os carrapatos podem sobreviver como adultos entre 155-568 dias, sem alimentação e transmitir a o agente por 155 dias após a infecção. Este fenômeno

permite aos carrapatos sobreviver ao inverno e infectar os hospedeiros na primavera seguinte (SONENSHINE, 1991; STICH et al., 2008).

Os carrapatos são mais abundantes durante as estações quentes e os casos mais agudos da EMC ocorre durante esses períodos. No entanto, estes casos podem acontecer ao longo de todo o ano, devido às mudanças nos ecossistemas que vem acontecendo hoje em dia, permitindo a atividade dos ixodídeos e transmissão do agente durante o ano inteiro (CARDOSO et al., 2010).



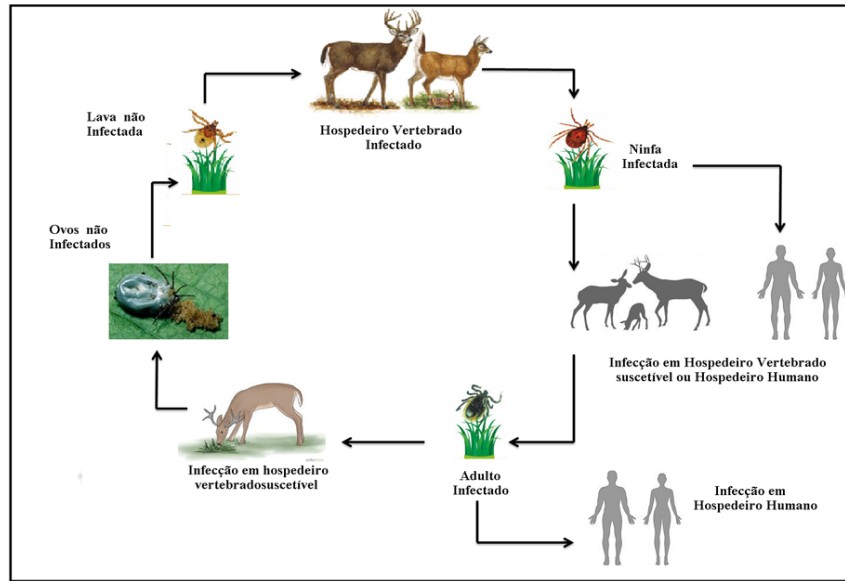
**Figura 1.-** Ciclo biológico do carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*.

#### 2.1.4.2 Ciclo biológico da *E. chaffeensis*

O ciclo de vida de *E. chaffeensis* tem como hospedeiro veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus* Zimmermann, 1780) que mantém um ciclo natural com o carrapato *A. americanum* (Quadro 2), principal responsável pela transmissão de erliquiose monocítica humana (EMH). O homem sofre infecção quando “interfere”, com o "ciclo de vida natural" entre micro-organismo, o carrapato e o cervídeo (Figura 2). Cabe ressaltar que, HME é considerada uma doença ocupacional nos Estados Unidos (RIKIHISA, 2015).

As larvas se infectam ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (por exemplo, o cervídeo) e transmitem as bactérias no estágio de ninfa. Ninfas infectadas podem transmitir *Ehrlichia chaffeensis*, durante sua alimentação, tanto a reservatórios susceptíveis como aos humanos. Os carrapatos adultos adquirem o parasita por transmissão transestadial ou alimentando-se de hospedeiros infectados (PADDOCK e CHILDS, 2003).

*Ehrlichia chaffeensis* foi isolada de outras espécies de carrapatos, tais como: *R. sanguineus* em Camarões (NDIP et al., 2009), *Dermacentor variabilis* (ROLAND et al., 1998; KRAMER et al., 1999) e *I. pacificus* (KRAMER et al, 1999) no sul dos Estados Unidos, *Ixodes ricinus* na Rússia (ALEKSEEV et al., 2001), *Amblyomma testidinarium* na China (CAO et al., 2000), *A. parvum* na Argentina (TOMASSONE, 2008) e *I. ovatus* no Japão (SHIBATA et al., 2000).



**Figura 2.-** Ciclo biológico do carrapato *Amblyomma americanum*

O cervo de cauda branca (*O. virginianus*) representa a única espécie de vertebrados reconhecidos como hospedeiro completo e suficiente para manter o ciclo de transmissão de *E. chaffeensis* (PADDOCK e CHILDS, 2003), porque esta espécie é a mais importante fonte de sangue para estágios adultos e juvenis de carrapatos *A. americanum* (GODDARD e VARELA-STOKES, 2008). Porém, esta bactéria já foi isolada a partir de muitas outras espécies, incluindo cabras domésticas (DUGAN et al., 2000), cães domésticos (BREITSCHWERDT, 1998; FRANK e BREITSCHWERDT, 1999; ZHANG et al., 2003); raposa vermelha (DAVIDSON et al., 1999b) ; coioote (KOCAN et al., 2000), e aves migratórias (ALEKSEEV et al., 2001).

#### 2.1.4.3 Ciclo biológico *Anaplasma platys*:

O ciclo biológico de *A. platys* agente causal da trombocitopenia cíclica canina (TCC), não está completamente descrito, contudo suspeita-se que *R. sanguineus* constitua um vetor efetivo, pelos numerosos casos de coinfeção com agentes transmitidos por *R. sanguineus*

(Quadro 3). Inokuma et al (2002) avaliaram trinta e duas fêmeas *R. sanguineus*, coletados em oito cães de vide livre, na Ilha de Okinawa, no Japão. Os autores reportaram sequências parciais do gene 16S rRNA (678 a 679 pb) de *A. platys* em três carrapatos (9,4%). Além disso, sabe-se que a transmissão mecânica por dípteros hematófagos acontece em casos de infecção por *A. marginale*, membro do gênero *Anaplasma* que tem como célula alvo os eritrócitos (SOUZA et al., 2001), mas ainda não foi demonstrado esta via na transmissão de *A. platys*.

**Quadro 3.** Espécies do gênero *Anaplasma*, espectro de hospedeiros, vetores mamíferos, doença produzida, e células infectadas (Adaptado de: RYMASZEWSKA e GREENDA, 2008)

Agente	Doença	Vetor	Hospedeiro	Célula alvo
<i>A. bovis</i>	Anaplasmoses Bovina	<i>Haemaphysalis</i> sp.	Ruminantes	Monócitos
		<i>Rhipicephalus</i> sp.		
		<i>Amblyomma</i> sp.		
<i>A. ovis</i>	Anaplasmoses Bovina	<i>Dermacentor</i> sp.	Ruminantes	Eritrócitos
<i>A. marginale</i>	Anaplasmoses Bovina	<i>Ixodes</i> sp.	Ruminantes	Eritrócitos
		<i>Dermacentor</i> sp.		
<i>A. centrale</i>	Anaplasmoses Bovina	<i>Haemaphysalis</i> sp.	Ruminantes	Eritrócitos
		<i>Ixodes</i> sp.		
<i>A. phagocytophilum</i>	Anaplasmoses humana	<i>Dermacentor</i> sp.	Humanos	Granulócitos
		<i>Ixodes</i> sp.		
<i>A. platys</i>	Trombocitopenia Cíclica Canina	<i>Rhipicephalus</i> sp.	Cão	Plaquetas

Os cães, hospedeiros principais de *R. sanguineus*, são considerados os principais reservatórios de *A. platys* e infecções por esta bactéria em outras espécies (LITTLE, 2010). No entanto, a caracterização molecular demonstrou a ocorrência em gatos (LIMA et al., 2010). Segundo Harvey (1990) não há transmissão vertical. *Anaplasma platys* não foi confirmada como uma causa de doença em seres humanos. Entretanto, Arraga-Alvarado et al., (2014), relataram evidência molecular que suporta infecção por *A. platys*, em duas mulheres na Venezuela com histórico de exposição a *R. sanguineus*, e com sinais clínicos crônicos e inespecíficos, incluindo dores de cabeça e dores musculares.

Além disso, outros agentes que são transmitidos por este carrapato, como *E. canis* e *Babesia canis*, potencializam as enfermidades (KORDICK et al., 1999; INOKUMA et al., 2003), dificultando o diagnóstico e o terapêutica dos cães doentes (SUKSAWAT et al., 2001).

## 2.1.5 EPIDEMIOLOGIA

### 2.1.5.1 Carrapatos:

#### 2.1.5.1.1 Biologia

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos principalmente de climas tropicais e subtropicais, encontrados geralmente em todos os vertebrados terrestres, especialmente os mamíferos, aves, répteis e alguns anfíbios; apesar de serem parasitas cosmopolitas, muitas espécies estão restritas a habitats específicos (GUGLIELMONE et al., 2003; GUGLIELMONE et al., 2004).

A ordem Ixodida, na qual pertencem os carrapatos, é dividida em três famílias: (1) Ixodidae, (2) Argasidae, e (3) Nuttalliella. Esta última apresenta algumas características em comum às famílias Ixodidae e Argasidae, e está composta por uma única espécie encontrada na África (*Nuttalliella namaqua*, Bedford, 1931) (HORAK, 2002).

É possível classificar os carrapatos da família Ixodidae em três tipos, de acordo com o número de hospedeiros que precisam para desenvolver o seu ciclo de biológico (EVANS, 1978). Por exemplo, o *R. sanguineus*, que caracteriza-se por parasitar três hospedeiros durante o seu ciclo de vida. Após se alimentar no primeiro hospedeiro, as larvas caem no chão, transformando-se em ninfas, as quais parasitam um segundo hospedeiro, que é novamente abandonado quando as ninfas voltam ao solo para se tornarem adultos e, finalmente, parasitar um terceiro hospedeiro. (BOWMAN, 2003).

#### 2.1.5.1.2 Distribuição

A distribuição dos carrapatos é muito ampla, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Na Oceania, Europa, Norte da Ásia e China o carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* a presença é maior, enquanto que na América, Ásia e África são relatados *R. microplus*, *R. appendiculatus* e *Amblyomma hebraeum* (KLOMPEN et al., 2000). Carrapatos do gênero *Amblyomma* estão amplamente distribuídos nos Estados Unidos, México e América do Sul (Figura 3) (HUGH-JONES et al., 1992).

O gênero *Dermacentor* é encontrado mais frequentemente no Canadá, EUA, México, América Central, América do Sul e Oeste da Índia. Já o gênero *Ixodes* é, principalmente, relatado nos EUA e Canadá, embora haja registros na Colômbia (HUGH-JONES et al., 1992; CORTÉS-VECINO, 2011), os gêneros *Rhipicephalus* e *Argas* são encontrados em todos os países tropicais do mundo, o gênero *Ornithodoros* está na Califórnia, oeste mexicano, Kansas, Flórida, América Central e América do Sul, e finalmente, o gênero *Otobius* é distribuído na América, Índia e África (HUGH-JONES, 2000).

A introdução de *R. sanguineus* nas Américas pode ter acontecido no final do século 15, durante a colonização europeia, ou mesmo anteriormente, já que há reportes de fósseis de cães domésticos no Peru, Bolívia e México datados de antes do século 15 (LEONARD et al., 2002). De qualquer forma, é provável que tenha acontecido múltiplas introduções em diferentes países do continente americano, resultando em diversas recombinações gênicas entre as populações estabelecidas (MORAES-FILHO et al., 2010).

Estudos genéticos relatam a existência de duas linhagens bem definidas dentro de *R. sanguineus*: a linhagem sul (também referida como espécie de clima temperado) e a linhagem do Norte (espécie tropical) (DANTAS-TORRES et al., 2017). A linhagem sul abrange carrapatos da Argentina, Uruguai, Chile, Itália e França. Já a linhagem norte envolve os carrapatos do Brasil, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e duas regiões do norte da Argentina (NAVA et al., 2012). De acordo com os resultados genéticos preliminares, ao parecer a linhagem norte parece ser uma espécie diferente de *R. sanguineus* s.s., sendo os carrapatos da linhagem sul, provavelmente, os verdadeiros *R. sanguineus* s.s, porém, não se sabe onde está o tipo “verdadeiro”. Diversos autores sugerem que seria essencial uma nova descrição de *R. sanguineus* s.s. baseando-se nos aspectos morfológicos e genética. Além disso, evitar o uso do nome *R. sanguineus* s.s. até que a espécie seja redescrita com base em um consenso entre os taxonomistas (GUGLIELMONE et al., 2003; DANTAS-TORRES et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2017)

A presença do carrapato marrom do cão (*R. sanguineus*), vetor responsável pela transmissão de algumas das espécies de *Ehrlichia*, já foi registrada em diferentes regiões metropolitanas das principais cidades do território peruano (BUSTAMANTE, 1998; ESTARES, 2014). Além disso, Glenney et al. (2004) relataram a presença de diversos gêneros

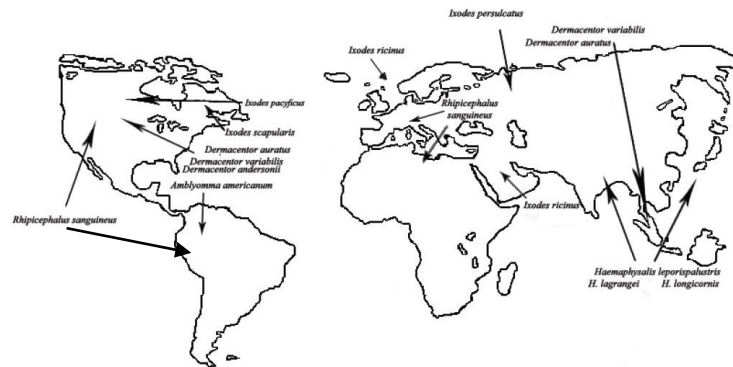


de carrapatos estudados em outras regiões do Peru, tal como Piura, encontrando-se o gênero *Amblyomma* em três espécies de animais, canina (66,6%), equina (31,8%) e suína (1,4%). Já a presença relatada de carrapatos do gênero *Ixodes* em cães foi de 87,5%, em gatos de 8,3% e em suínos de 4,1%. O gênero *Ixodes* foi observado nas localidades de Coletas, Masías e Naranjo, no Distrito de Sapillica, Província de Ayabaca (Piura). É importante ressaltar que nessas localidades já foram detectados seres humanos soropositivos para a *B. burgdoferi* mediante o teste de ELISA IgG/IgM (GLENNY et al., 2004). Os carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* estão relacionados à bactéria *R. rickettsii* (MARETZKI et al., 1994). Entretanto, foi demonstrada, experimentalmente, a transmissão de *E. canis* através deste vetor (JOHNSON et al., 1998).

Nas últimos anos, tanto a frequência quanto a intensidade das infestações por *R. sanguineus* em cães vêm aumentando. Por exemplo, no Rio Grande do Sul no Brasil, a prevalência deste ixodídeo em 1947, foi apenas de 1,29% (CORRÊA, 1955). Cinco décadas mais tarde, este mesmo carrapato foi encontrado em 48,8% de 450 cães da cidade de Porto Alegre (RIBEIRO et al., 1997). Já Ribeiro et al., (2016), com o objetivo de conhecer as espécies de carrapatos que parasitam os cães de rua da área urbana de Porto Alegre, reportaram que 52,44% dos cães albergavam carrapatos e destes, 93,22% estavam parasitados por *R. sanguineus*.

O gênero *Ehrlichia* tem como vetor mais comum e, frequente reservatório, o carrapato *R. sanguineus*, embora outras duas espécies de carrapatos, *A. americanum* e *Octobius megnini*, sejam descritas como vetores potenciais (RIKIHISA et al., 1991). Esta transmissão vetorial faz com que a prevalência da infecção por cada agente dependa da distribuição geográfica do vetor (Figura 3) (HINRICHSEN et al., 2001)

Os canídeos são suscetíveis a infecção de diferentes espécies de Rickettsias da família Anaplasmataceae como: *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, *A. phagocitophilum*, *Neorickettsia sennetsu*, *N. risticii* e *N. helminthoeca* (HEADLEY et al., 2006).



**Figura 3.-** Distribuição mundial dos vetores das bactérias da Família Anaplasmataceae em cães (Adaptado de: RYMASZEWSKA e GREY, 2008).

### 2.1.5.2 Fatores importantes na ocorrência da doença em humanos e animais

#### 2.1.5.2.1 Fatores inerentes ao vetor:

Entre os fatores que contribuem para a capacidade vetorial dos carrapatos podemos listar: 1) períodos prolongados de alimentação no hospedeiro, aumentando a probabilidade de aquisição e transmissão de agentes patogênicos; 2) longevidade; 3) alto potencial reprodutivo; 4) corpo esclerotizado conferindo proteção às condições ambientais; 5) as substâncias salivares, farmacologicamente ativas, facilitam o processo de alimentação e de inoculação de agentes patogênicos, porque modulam a resposta imunológica do hospedeiro; 6) vários episódios de alimentação durante o ciclo de vida; 7) o ambiente no intestino médio de carrapatos tem proteases intracelulares; agentes patogênicos, por conseguinte, não são ingeridos diretamente e não são expostos à ação proteolítica destas enzimas; e 8) a manutenção de microrganismos na natureza através da transmissão transovariana e transestadial (CORTÉS-VECINO, 2011).

Além disso, as possíveis diferenças na competência vetorial entre diferentes linhagens de *R. sanguineus* s.l poderiam determinar o papel potencial dos carrapatos de cada linhagem, como vetores de patógenos causando doenças em animais de companhia (CICUTTIN et al., 2015). Estudos comparativos, realizados com populações de *R. sanguineus* de diferentes origens geográficas, apontam que existem pelo menos duas linhagens neste carrapato, anteriormente denominado *R. sanguineus* sensu stricto (SZABÓ et al., 2005, BURLINI et al., 2010; MORAES-FILHO et al., 2011; LEVIN et al., 2012; NAVA et al., 2012; DANTAS-TORRES et al., 2013; LIU et al., 2013). Na América do Sul, pelo menos duas linhagens de *R. sanguineus* s.l foram identificadas: tropical e "temperate". A linhagem

tropical é distribuída nas áreas tropicais do Norte da Argentina, Brasil, Colômbia, Paraguai e Peru, e a linhagem "temperate" está associada a localidades temperadas e frias Da Argentina, Brasil, Chile e Uruguai (MORAES-FILHO et al., 2011a; NAVA et al., 2012).

#### 2.1.5.2.2 Fatores Climáticos

Fatores epidemiológicos associados a mudanças de temperatura, precipitação e umidade afetam a biologia e ecologia dos vetores, bem como os hospedeiros intermediários ou reservatórios naturais (GITHEKO et al., 2000).

A temperatura é um fator crítico para a capacidade vetorial, pois aumenta ou diminui a sobrevivência do vetor, determina a taxa de crescimento da população deste, muda a susceptibilidade à agentes patogênicos, modifica o período de incubação do patógeno no vetor e altera a atividade e o padrão de transmissão sazonal (LOPEZ e MOLINA, 2005). Por exemplo, os carrapatos podem sobreviver a temperaturas de até  $-7^{\circ}\text{C}$ , e recuperar a atividade vital aos  $4-5^{\circ}\text{C}$ . Eles são muito sensíveis a pequenas mudanças na temperatura. A diminuição da umidade reduz significativamente a viabilidade dos ovos. A mudança do clima poderia aumentar a população de carrapatos, prorrogar o período de transmissão sazonal e migração para novas áreas (RANDOLPH, 2001). Aparentemente, há uma forte relação entre a temperatura e o tamanho da população de *R. sanguineus*, tendo em vista que estes carrapatos são mais abundantes em número de espécies em lugares mais úmidos, sendo que algumas espécies podem sobreviver em jejum quase por um ano (DANTAS-TORRES, 2010). A depender da região onde esses ixodídeos se desenvolvem, eles podem ter até quatro gerações em um ano (LOULY et al., 2007)

#### 2.1.5.2.3 Fatores socioeconômicos e culturais

Além das mudanças climáticas, outros fatores podem influenciar a epidemiologia das doenças transmitidas por vetores artrópodes, como: composição da atmosfera, urbanização, desenvolvimento econômico e social e o comércio. A urbanização, por exemplo, aumenta a densidade de hospedeiros humanos suscetíveis, o que aumenta a taxa de transmissão mesmo com um número de vetores constante. Além disso, o desenvolvimento urbano perto de áreas rurais ou florestais pode levar a um maior contato entre o homem e reservatórios silvestres (LOPEZ E MOLINA., 2005).

Aparentemente, o contato com cães não é um fator de risco para infecção do homem. Harkess et al. (1989), reportaram que pacientes humanos com ehrlichiose possuíam cães sem evidência sorológica de infecção canina recente. No entanto, outros autores sugeriram que os cães são susceptíveis à rickettsia, a qual pode ser recuperada, mediante cultura de sangue, mesmo 26 dias após inoculação deste agente (ROHRBACH et al., 1990).

#### 2.1.5.2.4 Fatores de delineamento

Além dos fatores epidemiológicos relacionados às condições climáticas, o desenho experimental pode afetar os valores de prevalência das doenças transmitidas por carrapatos (DAGNONE et al., 2001). As prevalências das infecções, provavelmente, variam conforme a localidade, período da amostragem, estágio de desenvolvimento do carrapato e, extrinsecamente, pelo método de ensaio (por exemplo, o número de carrapatos colhidos, métodos de amostragem e sensibilidade do teste) (PADDOCK e CHILDS, 2003).

#### **2.1.5.3 Presença, frequência e distribuição geográfica da Erliquiose e Anaplasmosse canina.**

A erliquiose ocorre em muitos países de clima tropical e subtropical do mundo, coincidindo com a prevalência do seu vetor (Quadro 4) (ALMOSNY, 2002). É uma doença mundialmente distribuída em várias regiões geográficas. Isso tudo coincide com a prevalência nessas áreas do vetor *R. sanguineus* (WOLDEHIWET e RISTIC, 1993).

A primeira espécie do gênero *Ehrlichia*, reportada no Peru, foi *E. canis*, (CHAVERA et al., 1982). A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é considerada no Peru uma das principais doenças transmitidas por carrapatos na clínica de pequenos animais, chegando a apresentar soroprevalências de 16,5% em Lima (ADRIANZÉN et al., 2003) e de 76% em Sullana (SAN MIGUEL, 2006). Diferentes estudos em cães de diferentes regiões da América do Sul demonstram uma ampla distribuição e uma alta prevalência deste agente (Quadro 5)

**Quadro 4.** Distribuição geográfica *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp

<i>Ehrlichia</i> spp.	Distribuição Geográfica
<i>E. canis</i>	No mundo todo; principalmente nas regiões de clima tropical. A presença de animais infectados em regiões não endêmicas pode ser justificada pelo deslocamento de animais infectados em regiões endêmicas mas que só vieram a apresentar sintomas após um período de latência que pode
<i>E. chaffeensis</i>	Continente Americano
<i>N. risticii</i>	Estados Unidos e Canadá
<i>N. risticii</i> subsp. <i>atypicalis</i>	Estados Unidos
<i>E. ewingii</i>	Estados Unidos (sul e médio oriente)
<i>A. phagocytophilum</i>	Estados Unidos (costa oeste, noroeste, norte central)
<i>Human granulocytic Ehrlichia</i>	Estados Unidos (médio oeste e nordeste) e Europa
<i>A. phagocytophilum</i>	Reino Unido, África, Ásia, Europa (Suécia, Suíça)
<i>A. platys</i> ( <i>E. platys</i> )	Estados Unidos, Europa (Grécia, Itália, Israel, França) e América do Sul

Adaptado de: NEER et al., 2002.

Carrapatos, principalmente da espécie *R. sanguineus*, possuem grande importância na disseminação de patógenos de importância zoonótica, sendo reportado como vetor de *E. canis*. Em um estudo realizado no período de 2008 a 2009, na cidade de Cuiabá no estado de Mato Grosso, os autores reportaram a presença de DNA de *A. platys* e *E. canis* em carrapatos *R. sanguineus*. Dos espécimes coletados, 29,6% (81/272) amplificaram DNA de agentes ehrlichiais, onde 38 (17,9%) amplificaram para *Ehrlichia canis* e 32 (15,7%) para *A. platys* (DE PAULA et al., 2012). No estado de São Paulo, Aguiar et al., (2007), reportaram prevalências de 2,3%(4/165), 6,2%(10/162), e 3,7%(6/162) em carrapatos de cães em três áreas urbanas, todos eles identificados como *R. sanguineus*. Já nos municípios de Itapuã e Cajazeiras na Bahia, SOUZA et al., (2010), mediante nested-PCR, avaliaram a presença de DNA de *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, reportando 21,9% (7/32) de infecção para *E. canis* em *R. sanguineus*, não havendo amplificação de fragmento de DNA para os outros agentes.

Uma pesquisa realizada na cidade Mérida no México, os autores reportaram uma frequência de infecção 18,5% (37/200) para *E. canis* em *R. sanguineus* (PAT-NAH et al.,

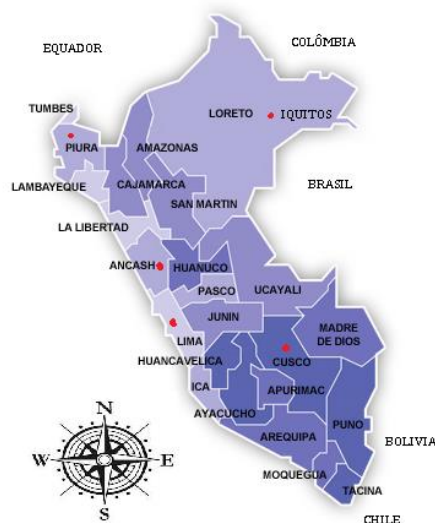
2015). Já em Israel, Harrus et al., (2011), com o objetivo de identificar agentes patogênicos de importância veterinária, avaliaram um total de 1196 carrapatos agrupados em 131 pools: 83 de *R. turanicus* e de 48 *R. sanguineus* (com dois a dez carrapatos por pool). Em *R. turanicus* o DNA de *E. canis* foi detectado em oito pools (9,6%), *A. platys* em um pool (1,2%), o DNA de *A. bovis* em quatro pools (4,8%) e DNA de *B. vogeli* em um pool (1,2%). Já em *R. sanguineus*, o DNA de *E. canis* foi detectado em cinco pools (10,4%), *A. bovis* em um pool (2,1%), e o DNA de *B. canis vogeli* foi detectado em dois pools (4,2 %).

**Quadro 5.** Prevalência de *Ehrlichia canis* na América do Sul

Local	Positivos %	Teste	População	Autor(es)
<b>Argentina</b>				
Buenos Aires	6/86 (6,9%)	PCR	Suspeito	Eiras et al., (2012)
<b>Brasil</b>				
São Paulo	48/52 (92,3%)	ELISA	Suspeito	Oliveira et al. (2000)
São Paulo	154/198 (77,7%)	PCR	Suspeito	Diniz et al. (2007)
São Paulo	67/217 (30,9%)	Nested PCR	Hospital	Bulla et al. (2004)
Rio de Janeiro	34/226 (15%)	PCR	Aleatório	Macieira et al. (2005)
Minas Gerais	101/226 (44,7%)	RIFI	Aleatório	Costa Jr et al. (2007)
Paraná	28/129 (22%)	PCR	Hospital	Dagnone et al. (2003)
Bahia	12/153 (7,8%)	Nested PCR	Hospital	Carvalho et al. (2008)
Rio Grande Sul	58/153 (37,9%)	RIFI	Aleatório	Aguiar et al., (2007)
	40/161 (24,8%)	RIFI	Aleatório	Aguiar et al., (2008)
Pernambuco	52/105 (49,5%)	ELISA	Suspeito	Labarthe et al. (2003)
Mato Grosso	10/26 (38,4%)	Nested PCR	Suspeito	Dagnone et al. (2009)
Mato Grosso	108/254 (42,5%)	RIFI	Aleatório	Silva et al., (2010)
<b>Colômbia</b>				
Valle del Cauca	39/72(54,2%)	Nested PCR	Suspeito	Rojas et al., (2011)
Bogotá	14/21(66,7%)	RIFI	Aleatório	Vargas-Hernández et al., 2012
Bucaramanga	23/39(58,9%)	Nested PCR	Aleatório	Vargas-Hernández et al., 2012
Villavicencio	14/31(45,2)	Nested PCR	Aleatório	Vargas-Hernández et al., 2012
<b>Equador</b>				
Guayas	25/100 (25%)	ELISA	Aleatório	Marquéz, et al., (2011)
<b>Peru</b>				
Lima	23/140 (16,5%)	ELISA	Aleatório	Adrianzen et al., (2003)
Lima	58/77 (75,32%)	ELISA	Suspeito	Hoyos et al., (2007)
Lima	11/25 (44%)	PCR	Suspeito	Vinasco et al., (2007)
<b>Venezuela</b>				
Lara	17/51 (35%)	PCR	Aleatório	Unver et al., (2003)

Desde o primeiro reporte de *E. chaffeensis* nos EUA por Anderson et al. (1991), diferentes estudos de prevalência foram realizados em diferentes estados, para determinar a distribuição de Ehrlichiose Monocítica Humana (EMH) nesse país e estabelecer medidas de prevenção e controle. O número de casos relatados ao "Center for Disease Control and Prevention" (CDC) tem aumentado constantemente desde que a doença tornou-se reportável e de 200 casos no ano de 2000 foram documentados 961 casos no ano de 2008. Apesar disso, em 2010 foi observada uma diminuição no número de casos. Quanto a incidência (número de casos por milhão de pessoas), esta aumentou, de menos de 1 caso por milhão de habitantes em 2000 para 3,4 casos por milhão em 2008, e desde então caiu para 2,5 casos por milhão de habitantes a partir do 2010 (Figura 5). Atualmente é uma doença de notificação obrigatória (CDC, 2011).

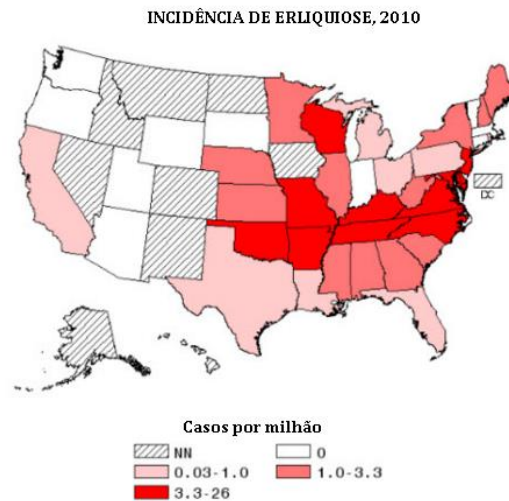
Em 2009, Moro et al., mediante a reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), reportaram soroprevalências para *E. chaffeensis* de 25% (10/40) na comunidade de Cura Mori, Departamento de Piura (costa norte do território peruano), 23% (9/40) na comunidade de Cochapata, Departamento de Cuzco (Região dos Andes peruanos), 3% (1/40) na comunidade Pampas, Lima (costa central) e finalmente 3% (1 / 40) na comunidade de Santo Tomas, Departamento de Iquitos (Região Leste) (Figura 4). Além disso, em uma pesquisa realizada pelo Instituto Nacional de Saúde (INS) foi observada, também mediante o teste de RIFI, uma soroprevalência de 9,2 % (12/130) para *E. chaffeensis* no departamento de Ancash em Peru (ANAYA et al., 2009).



**Figura 4.-** Localidades com indivíduos soropositivos para *Ehrlichia chaffeensis* reportadas no estudo de Moro et al., 2009.

No Brasil, *E. chaffeensis* foi identificada a partir de amostras de sangue periférico, num Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* Illiger, 1815) (MACHADO et al., 2006). Já na Argentina, demonstrou-se a presença de DNA de *E. chaffeensis* em carrapatos da espécie *Amblyomma parvum*, no Departamento de Moreno Santiago del Estero, porém ainda não foram publicados relatos a respeito da identificação do DNA da bactéria em amostras de sangue periférico humano (TOMASSONE et al., 2008).

Em 2008 foi reportado um caso de uma criança de 9 anos que apresentava sinais clínicos compatíveis com erliquiose em Carabobo, na Venezuela. O agente foi identificado como *E. chaffeensis* mediante o uso de técnicas moleculares (PCR) (MARTINEZ et al., 2008).



**Figura 5.** –Incidência anual (casos por milhão) *Ehrlichia chaffeensis* nos diferentes estados nos Estados Unidos, em 2010. (NN= Não notificável)

*Anaplasma platys* já foi descrito em diferentes regiões do mundo: Estados Unidos, Grécia, França, Itália, Israel, China, Japão e Tailândia (BROWN et al., 2001).

Estudos realizados na América do Sul, utilizando técnicas moleculares, apontaram percentuais de positividade variados em cães para *A. platys*. No Brasil, estudos realizados em cães nas regiões de Cuiabá/MS e Recife/PE, reportaram frequências de 10,3% e 48,78% , respectivamente (RAMOS et al., 2010; SALES et al., 2007). Na região centro-oeste do território brasileiro, em Dourados estado de Mato Grosso do Sul, mediante um estudo de levantamento retrospectivo de casos de hemoparasitoses no Hospital Veterinário da Faculdade Anhanguera, os autores relataram que 3,8% dos cães foram diagnosticados positivos para *E. canis* e 2,4% para *A. platys* (RODRIGUES et al., 2008). Em Brasília, Vasconcelos et al.



(2008), avaliando 2952 históricos de pacientes caninos do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, reportaram que 0,81% dos animais eram positivos para *Ehrlichia* sp. e 0,69% para *A. platys*. Accetta et al. (2008), avaliaram 3019 esfregaços sanguíneos de cães da Região dos Lagos e observaram que 1,8% (55/3019) das amostras eram positivas para *Ehrlichia* sp. e 1% (29/3019) para *A. platys*.

Já no Uruguai, Carvalho et al. (2017), reportaram uma frequência de 4,2 % (8/191) na região de La Comarca Lagunera. No Peru, uma pesquisa realizada na região de Lima Metropolitana revelou, mediante Nested PCR, uma prevalência de 1,4% (2/144) para *A. platys* em caninos domésticos (TATEISHI et al., 2015).

Na Argentina, em um estudo realizado em cães domiciliados e seus carrapatos, Cicuttin et al. (2014), reportaram uma frequência de 13,5% (7/52) em cães para *A. platys*. Entretanto, os autores não acharam ixodídeos positivos para agentes da família Anaplasmataceae.

A infecção por *A. platys* em *R. sanguineus* s.l tem sido relatada em diferentes países da Ásia, África, Europa e América do Sul (INOKUMA et al., 2000; SANOGO et al., 2003; YBANEZ et al., 2012; LATROFA et al., 2014; RAMOS et al., 2014; CICUTTIN et al., 2015). Na Argentina, CICUTTIN et al., (2015), reportaram uma infecção de 0,5%(1/181) por *A. platys* em uma amostra de *R. sanguineus* s.l pertencente à linhagem tropical. Além disso, Oscherov et al. (2011), reportaram uma infecção de 8%(7/79) por *A. platys* em *R. sanguineus* s.l na província de Corrientes, onde prevalecem populações de *R. sanguineus* s.l da linhagem "temperate" (NAVA et al., 2012). Entretanto, em um estudo realizado por Latrofa et al.,(2014), em diferentes regiões do mundo: Brasil (São Vicente Férrer, Pernambuco), Colômbia (Calí, Medellín), Costa Rica (São José), França (Pamiers, Ariège), Guatemala, Honduras (São Pedro), Índia (Mumbai, Maharashtra), Malásia, África do Sul ( Província do Cabo), Tailândia (Bangkok) e Vietnã (Cidade de Ho Chi Minh, Dong Nam Bo), onde a presença da linhagem tropical do *R. sanguineus* s.l foi predominante, os autores não reportaram a presença deste agente.

## **2.1.6 IMUNOPATOGENIA**

### **2.1.6.1 Imunopatogenia de *Ehrlichia canis*:**

Na EMC o período de incubação pode variar, na infecção natural, de 8 a 20 dias, após isso ocorrem as três fases classicamente descritas da doença: aguda, subclínica e crônica. Estas fases foram descritas em infecções experimentais, no entanto, não são facilmente distinguíveis na infecção natural (BREITSCHWERDT, 2000; NEER e HARRUS, 2006).

#### 2.1.6.1.1 Internalização do agente e a fase aguda

A Infecção do hospedeiro vertebrado ocorre após o repasto sanguíneo pelo carrapato vetor infectado, deste modo as secreções salivares do carrapato infectam a área de alimentação no hospedeiro susceptível, ocasionando a passagem mecânica do micro-organismo (NEER, 2000).

Nos agentes ehrlichiais, as camadas de peptidoglicano e lipopolissacarídeos (LPS) não estão presentes na parede celular. Essa deficiência resultou no desenvolvimento de estruturas protéicas complexas na membrana externa, que possuem importante papel na evasão do sistema imune e na interação de *E. canis* com as células do hospedeiro (DUNNING et al., 2006; MAVROMATIS et al., 2006). A proteína P120 é uma adesina que poderia também contribuir para a internalização de *Ehrlichia*. Em estudos *in vitro* mostram a aderência e a invasão das células HeLa pela *Escherichia coli* contendo um plasmídeo que expressa essa proteína de membrana externa de 120 kDa das *Ehrlichia* spp. (POPOV et al., 1998; POPOV et al., 2000; DOYLE et al., 2006).

Os organismos ehrlichiais internalizados são envolvidos pela membrana da célula hospedeira formando um endossoma que se mantém diferente dos outros compartimentos citoplasmáticos por não se fundirem com os lisossomas (RIKIHISA, 2000; CHENG et al., 2014). Mediante a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), demonstrou-se que as mórulas de *E. canis* apresentam-se delimitadas por uma membrana vacuolar simples, contendo células ehrlichiais arredondadas ou ovóides envoltas por uma membrana dupla, sendo a membrana interna lisa e a externa ondulada (HILDEBRANT et al., 1973; LIN e RIKIHISA, 2003).

Monócitos e macrófagos são células imunes equipadas com poderosas defesas antimicrobianas inatas (RIKIHISA et al., 2003). A resposta imune inata se inicia pela fagocitose dos patógenos pelos macrófagos, que por sua vez desencadeiam a resposta imune adaptativa. Para isso os macrófagos possuem Receptores de Reconhecimento de Padrão

(ADEREM e UNDERHILL, 1999). Um outro mecanismo que possibilita a captação seletiva de macromoléculas específicas é a endocitose mediada por receptor. Esses receptores estão concentrados em pequenas invaginações da membrana plasmática (COOPER, 2001).

Em ambos os processos de endocitose inato ou mediado por receptor, a formação do fagossomo parece envolver diversos mecanismos capazes de desencadear diferentes vias de sinalização (RIKIHISA, 2015). Não obstante, após internalizados, os patógenos modificam o compartimento endocítico para impedir a fusão com os lisossomos. A estratégia mais comum utilizada é a de induzir modificações no compartimento endossomal. As modificações do compartimento devem ocorrer de pelo menos duas formas: primeiro alguns patógenos utilizam mecanismos de escape da fusão lisossomal e, segundo, estabelecem uma rota de obtenção de nutrientes importantes a partir do citosol do hospedeiro (ALBERTS et al., 2006).

A sobrevivência da *Ehrlichia* no interior da célula pode ser influenciada por meio de processos bioquímicos e moleculares complexos que envolvem, por exemplo, a aquisição de ferro. O ferro é essencial para citocromos e outras enzimas que contenham ferro, e em *E. chaffeensis* os primeiros endossomas formados acumulam receptores de transferrina (MOTT et al., 1999). Dado que estes endossomas são ligeiramente ácidos, *Ehrlichia* pode adquirir diretamente o ferro dos complexos ferro-transferrina presentes nestes vacúolos (BAMEWALL e RIKIHISA, 1994; MOUMÈNE e MEYER, 2016). Além disso, nesses compartimentos, ou inclusões, não há geração de ânions superóxido ( $O_2^-$ ). A notável habilidade dessas bactérias em prevenir a geração de  $O_2^-$ , está na não ativação da enzima NADPH oxidase (MOTT et al., 2002; LIU et al., 2012).

A habilidade de se replicar na célula do hospedeiro funciona como um mecanismo de proteção para o microorganismo, permitindo-o escapar dos anticorpos (MOUMÈNE e MEYER, 2016). Além disso, durante a infecção por *Ehrlichia* sp., repetidas recombinações ocorrem nos genes das principais proteínas antigênicas do microorganismo, levando a formação de vários epítomos antigênicos distintos. Com isso, as bactérias conseguem escapar das defesas do organismo, resultando em infecções persistentes (ALVES et al., 2014).

Após a entrada, a proliferação da *E. canis* por fissão binária no interior de células monocíticas se inicia a fase aguda da doença, que consiste na multiplicação e disseminação

das bactérias através da circulação sanguínea ou linfática, o que, habitualmente, dura entre duas e quatro semanas (THOMAS et al., 2009).

A replicação ocorre inicialmente em leucócitos mononucleares, que, em seguida, colonizam órgãos constituídos por células mononucleares, tais como o baço, o fígado, a medula óssea e gânglios linfáticos onde causam hiperplasia com infiltração de células plasmáticas (NEER, 2000). As células infectadas são transportadas para outros órgãos através da corrente sanguínea, especialmente para pulmões, rins e meninges, aderindo-se ao endotélio vascular e determinando lesões inflamatórias, como a vasculite, principalmente, de origem imunomediada pela deposição de complexos antígeno-anticorpo (Ag-Ab). Em alguns casos, as lesões podem se tornar muito graves desencadeando um quadro de coagulação intravascular disseminada (CID) e comprometendo, seriamente, a vida do animal (SAINZ et al., 2000).

Durante essa fase os sinais clínicos são, geralmente, moderados e inespecíficos, incluindo febre, depressão, anorexia, linfadenopatia, perda suave de peso, petéquias, equimoses e esplenomegalia (ALMOSNY, 1998; NEER e HARRUS, 2006; HARRUS 2015), no entanto, em diversos casos, os sinais podem ser inaparentes (BREITSCHWERDT, 2000).

Sinais hemorrágicos podem ocorrer ocasionalmente, embora sejam mais frequentes durante a fase crônica da doença. Assim, mesmo em cães com trombocitopenia, quadros deste tipo aparecem apenas excepcionalmente. Estes sinais estão relacionados à redução da função plaquetária e secreção de fator de inibição da migração plaquetária pelos linfócitos (LITTLE, 2010). Também são descritos quadros com sintomatologia respiratória e nervosa devido ao processo inflamatório e hemorrágico. Exames radiológicos descreveram alterações radiopacas intersticiais difusas no pulmão (GREENE, 1997). Os sinais neurológicos podem ser atribuídos, além das hemorragias, pela vasculite e extensa infiltração plasmocítica das meninges (STICH et al., 2008; HARRUS e WANNER, 2011)

Tem sido demonstrada a presença de anticorpos anti-plaquetários (AAP) no soro de animais infectados com *E. canis*, justificando a destruição das plaquetas por processos imunomediados. AAP foram detectados, em cães experimentalmente infectados, a partir do sétimo dia até o 17º pós-infecção (HARRUS et al., 1996; HARRUS et al., 2001). Estes anticorpos têm sido demonstrados em pacientes com Erliquiose Granulocítica Humana em até

80% dos casos. Nesta fase, ainda não são observadas lesões na medula óssea, pelo contrário, apesar da trombocitopenia os cães afetados demonstram trombocitopoiese ativa (WANER et al., 1995).

Vem sendo relatado que as concentrações de gamaglobulinas podem aumentar durante as três fases da doença, embora alguns autores reportem uma baixa correlação entre os valores da concentração de gama globulinas e os títulos de anticorpos específicos contra *E. canis* (REARDON e PIERCE, 1981; HARRUS et al., 1996; HARRUS et al., 2001). Isto sugere que os anticorpos anti- *E. canis* não são a fonte primária de gama globulinas. Estudos mostram que não há correlação com títulos de anticorpos específicos anti-*E. canis* com a presença de APA (HILDEBRANDT et al., 1973; WOODY e HOSKINS, 1991; RISTIC e HOLLAND, 1993; WANER et al., 1995; HARRUS et al., 2001).

Foi demonstrada a presença do fator de migração plaquetária (PMIF), em cães infectados por *E. canis*. Os valores desta citosina sérica estão inversamente relacionados com a contagem das plaquetas, sendo que as maiores concentrações de PMIF estão relacionadas com as cepas mais virulentas de *E. canis*. A PMIF é produzida pelos linfócitos, quando expostos a monócitos infectados, impedindo a migração do agente (NEER, 2000).

Rikihisa et al. (1994), relataram valores aumentados da proteína C reativa, em cães experimentalmente infectados com *E. canis*, encontrando níveis elevados entre o 4º e 6º dias após a infecção havendo uma diminuição nos títulos desta proteína para níveis de pré-infecção no 34º dia, o que fortalece a hipótese de que existe resposta protéica na fase aguda da EMC.

Além dos mecanismos humorais, a resposta imune mediada por células, tem sido amplamente estudada. Patógenos, como *Ehrlichia*, que têm como alvo o sistema imune inato, ativam a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, induzindo o desenvolvimento de resposta Th1 e secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4, o que determinaria a resistência do hospedeiro à infecção (CASTRO, 2004). Não obstante, a imunossupressão induzida pela saliva do carrapato pode facilitar a instalação do agente infeccioso (WIKEL, 1999), visto que a saliva do *R. sanguineus* inibe a proliferação de células T, interfere na função de macrófagos e promove um desequilíbrio na produção de citocinas, aumentando IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , e reduzindo IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , havendo assim, a

inversão de uma resposta do tipo Th1 para Th2 (ISMAIL et al., 2010; MANSUETO et al., 2012).

A avaliação imunohistoquímica de órgãos linfóides (baço e linfonodos) de cães experimentalmente infectados com *E. canis*, revelou uma redução significativa na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII) (CASTRO, 2004). A expressão dessas moléculas de MHCII é necessária à maturação de células T em linfócitos T CD4+, que possuem um importante papel na elaboração e potencialização da resposta imune humoral e celular (GRUSBY et al., 1991).

#### 2.6.1.1.2 Fase sub-clínica:

Cães infectados naturalmente e não tratados ou depois de tratamento interrompido costumam ingressar em fase subclínica da EMC (RISTIC e HOLLAND, 1993; HARRUS et al., 2004). Em cães infectados experimentalmente, o achado laboratorial mais frequente na infecção subclínica foi a trombocitopenia, associada a altos títulos de anticorpos contra *E. canis*. Esta fase pode persistir por anos. Cães imunocompetentes provavelmente eliminarão o parasita, enquanto cães com a resposta imune insuficiente tendem a desenvolver a fase crônica da doença (WANER et al., 1997; HARRUS, 2015)

Infecções experimentais indicam que o baço é o órgão no qual *E. canis* se mantém durante a fase subclínica da doença. Este sequestro da *E. canis*, principalmente pelo baço e pela medula óssea, impede uma resposta imunitária celular, ou seja, o organismo não identifica o agente patogênico intracelular (HARRUS et al., 1996; HARRUS et al., 2004). Cães esplenectomizados infectados experimentalmente apresentaram doença mais branda do que cães não esplenectomizados (HARRUS et al., 1998).

Os cães que não obtiverem sucesso na eliminação do parasito durante a fase subclínica podem se manter nessa fase por anos ou ingressar na fase crônica da doença (NEER e HARRUS, 2006).

### 2.6.1.1.3 Fase Crônica:

O quadro clínico desta fase depende de fatores como idade, imunocompetência, virulência da cepa, infecções concomitantes, e localização geográfica (QUINN, 1997). A fase crônica da doença, na sua forma mais severa, é caracterizada por pancitopenia, devido à hipoplasia ou até mesmo a uma aplasia de medula. O prognóstico nestes casos é desfavorável, com os animais podendo vir a óbito por infecções secundárias, sangramentos incontroláveis e/ou anemia (NEER e HARRUS, 2006). Este nível de lesão da medula óssea crônica é provavelmente o produto de deposição do complexo imunitário e destruição de células do sangue induzindo a proliferação de tecido fibroso. Os mecanismos imunológicos, nesta fase da doença são desconhecidos, mas suspeita-se que as respostas celular e humoral são seriamente afetadas devido ao esgotamento das populações de células circulantes (SAINZ et al., 2000). Sabe-se que os anticorpos que circulam nas fases posteriores da fase crônica tendem a cair para níveis muito baixos. Isto pode ser entendido pela ausência de células produtoras de anticorpos (GREENE, 1997).

Esta etapa caracteriza-se por anemia, leucopenia, trombocitopenia, comprometimento da medula óssea, depressão, anorexia, emaciação e hemorragias. Em particular, esplenomegalia e hepatomegalia são os achados clínicos mais comuns nesta fase crônica da doença (DAGNONE et al., 2001). O prognóstico nestes casos é desfavorável, com os animais podendo vir a óbito por infecções secundárias, sangramentos incontroláveis e/ou anemia (NEER e HARRUS, 2006).

### 2.1.6.2 Imunopatogenia *Ehrlichia chaffeensis*

A patogênese da EMH inclui um período de incubação de 8 a 20 dias, seguido de uma fase aguda, uma subclínica e, as vezes, uma fase crônica. Durante a fase aguda, o parasita entra na circulação sanguínea ou linfática e localiza-se nos macrófagos do sistema reticulo-endotelial do baço, fígado e nódulos linfáticos, onde se replica por divisão binária (HARRUS et al., 1999; PADDOCK e CHILDS, 2003).

*Ehrlichia chaffeensis* não possui os genes para a biossíntese de lipopolissacarídeo (LPS), assim como quase todos os genes para a biossíntese de peptidoglicano, razões pelas quais este agente patogênico não desencadeia uma resposta imune inata apropriada

(RIKIHISA, 2003). Portanto, a perda de genes para a biossíntese de LPS e peptidoglicano também facilita a adaptação das bactérias às células do carrapato vetor. Além disso, a perda destes genes explica a estrutura incomum das bactérias, envolta por uma membrana externa fina, sem evidência de que tenha cápsula ou pili. Por isso, estas bactérias utilizam as proteínas da membrana externa para se unir com a célula hospedeira (RIKIHISA et al., 1997; RIKIHISA et al., 2015)

Uma vez que *E. chaffeensis* entra no organismo, ela apresenta uma afinidade para monócitos e linfócitos, promielócitos, metamielócitos, bastões e neutrófilos segmentados (PADDOCK e CHILDS, 2003). Esta bactéria replica dentro do citoplasma formando estruturas denominadas "mórulas". A célula infectada contém tipicamente 1 a 2 mórulas, mas podem ser encontradas até 15 mórulas em células de pacientes imunossuprimidos. Os organismos internalizados são envolvidos pela membrana da célula hospedeira formando endossomas que se matém distintos dos outros compartimentos citoplasmáticos não se fundindo com os lisossomas (PADDOCK e CHILDS, 2003; RIKIHISA, 2003; THOMAS et al., 2009).

Uma vez que as bactérias estabelecem vacúolos para sobreviver, necessitam encontrar uma maneira para adquirir nutrientes, para então poderem se proliferar neste compartimento. A aquisição de ferro é dependente do estoque de ferro presente no citoplasma das células hospedeiras (MOTT et al., 1999). Rikihisa e Barnewall (2002) reportaram que este agente patogênico não consegue estabelecer uma infecção quando os monócitos são tratados com um quelante de ferro chamado deferoxina.

*Ehrlichia chaffeensis*, assim como *A. phagocitophilum*, tem a capacidade de obter colesterol a partir da célula hospedeira (RIKIHISA, 2015). O colesterol é um componente de grande importância para *E. chaffeensis*, já que estas bactérias são frágeis e pleomórficas, e, como já foi mencionado, carecem de uma parede celular ou camada de peptidoglicano. Este agente não tem os genes para a biossíntese de lipídio A, para o qual se desenvolveu a capacidade de obtenção de colesterol das células hospedeiras (LIN e RIKIHISA, 2003). A dependência do colesterol apresentada por este agente para a infecção e sobrevivência sugere que altos níveis de colesterol no sangue exacerbam a gravidade da infecção em mamíferos (RIKIHISA, 2009).



O genoma de *E. chaffeensis* não possui genes que codificam as enzimas detoxificadoras (como a catalase) nem sistemas reguladores sensíveis ao oxigênio (OxyR e SoxRS) o que significa que esta bactéria desenvolveu estratégias para prevenir a ativação da NADPH oxidase, a qual catalisa a redução do oxigênio atmosférico a O<sub>2</sub><sup>-</sup> utilizando o NADPH citoplasmático do hospedeiro (RIKIHISA, 2009).

Devido o fato de não ter sido encontrada atividade de endotoxinas ou exotoxinas durante a infecção por *E. chaffeensis*, as citocinas pro-inflamatórias do hospedeiro são consideradas as responsáveis pelas alterações patológicas e dos sinais clínicos observados na EMH (RIKIHISA, 2003).

Rikihisa e Lee (1996) relataram que *E. chaffeensis* não induz a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e GM-CSF, o que pode retardar o desenvolvimento da resposta imune protetora e, por conseguinte, contribuir para que a bactéria se estabeleça em macrófagos. Além disso, as células de invertebrados também possuem fortes mecanismos de defesa inata que respondem a PAMPs (LITTLE et al., 2005). Portanto, a perda de genes para a biossíntese de LPS e peptidoglicano também facilita a adaptação das bactérias às células do carrapato vetor. A perda dos peptidoglicanos fornece também outros benefícios, fornecendo à bactéria *E. chaffeensis* a flexibilidade para sobreviver no limitado espaço intravascular e a plasticidade necessária para que os leucócitos infectados possam se mover no meio intravascular (RIKIHISA et al., 1997).

A apoptose é um mecanismo importante para eliminar patógenos intracelulares. Uma variedade de agentes patogênicos induz a apoptose de células hospedeiras, mas se conhece outros em *Ehrlichia chaffeensis* que inibem a apoptose de células hospedeiras (DeLEO, 2004). É possível que *E. chaffeensis* iniba a atividade transcricional celular durante a fase inicial da infecção e/ou iniba a apoptose, prejudicando assim as defesas celulares do hospedeiro e mantendo uma oportunidade de crescimento prolongado para a bactéria (ZHANG et al, 2004).

Uma vez que são patógenos intracelulares imagina-se que a imunidade celular seja um componente importante da eliminação bem sucedida de *E. chaffeensis*. No entanto, a ativação de macrófagos por si só pode não ser suficiente para a eliminação efetiva do agente patogênico (PADDOK e CHILDS, 2003). *Ehrlichia chaffeensis* é capaz de evitar a estimulação da produção de IL-12 e suprime a produção de IL-1, IL-15 e IL-18 que

desempenham um papel crucial na estimulação das células NK e da produção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1, que ativam macrófagos tornando-os capazes de destruir as bactérias que foram fagocitadas (ZHANG et al., 2004).

### 2.1.6.3 **Imunopatogenia *Anaplasma platys***

A transmissão natural de *A. platys*, o agente etiológico da Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC), ocorre quando o vetor infectado se alimenta em um animal e transmite a bactéria por meio das secreções salivares (PREZIOSI e COHN, 2002). As células de eleição deste agente são as plaquetas, porém, foi relatado que *A. platys* pode infectar promegacariócitos e megacariócitos, células precursoras provenientes da medula óssea (TOMASSI et al., 2014).

O período de incubação do agente é de 8 a 15 dias, quando ocorre um grande número de plaquetas parasitadas em esfregaços sanguíneos. Poucos dias após a infecção ocorre um decréscimo das plaquetas circulantes, esse número pode chegar até 20.000 plaquetas/ $\mu$ L ou menos, tornando-se difícil o diagnóstico através de exame direto (NEER e HARRUS, 2006; EDLESTONE et al., 2007).

A infecção aguda é caracterizada por uma parasitemia em plaquetas, seguido de episódios de trombocitopenia que ocorre em intervalos de 7 a 14 dias (HARVEY et al., 1978; FOGLIA et al., 2006). Acredita-se que o agente se adere na superfície plaquetária e entra na plaqueta através de endocitose (NEER e HARRUS, 2006). Inokuma et al. (2002) relataram que nas plaquetas de cães infectados podem ser observados diferentes estádios de desenvolvimento de *A. platys*, se apresentando de forma isolada, em pares ou em grupos, dentro de vacúolos. Além disso, demonstraram através de microscopia eletrônica, que apesar do lisossomo se localizar próximo ao vacúolo contendo mórulas de *A. platys*, este não tinha contato com as mesmas, concluindo que a infecção por *A. platys* impede a fusão dessas estruturas da mesma forma que outras espécies de *Ehrlichia*.

Alguns relatos indicaram que os cães infectados, em geral, não são afetados clinicamente, e raramente apresentam sinais relevantes de sangramento (GAUNT et al., 2010). No entanto, outros estudos relataram sinais clínicos, tais como: febre, anorexia, letargia, depressão, perda de peso, secreção nasal mucopurulenta, mucosas pálidas, linfadenomegalia, hiperplasia linfóide, sangramento leve ou edema em vários órgãos. Outros

autores, mencionaram alterações sanguíneas diferentes de trombocitopenia, como, hematócrito baixo, monocitose e baixa concentração de albumina (HARRUS et al., 1997; EDDLESTONE et al., 2007b).

Inicialmente, a trombocitopenia se desenvolve como consequência do dano plaquetário sofrido pela replicação do agente (NEER e HARRUS, 2006). As plaquetas infectadas são removidas da circulação por sequestro esplênico. Após o desaparecimento dos microrganismos a plaquetometria volta ao normal em três ou quatro dias. Não obstante, de sete a quatorze dias após o primeiro episódio ocorre outra parasitemia na qual, novamente, o número de plaquetas decresce. Alguns autores acreditam que mecanismos imunomediados podem estar envolvidos nos episódios trombocitopênicos cíclicos, o que resulta em esporádicas aparições do parasito e trombocitopenias moderadas (WOODY e HOSKINS, 1991; TROY e FORRESTER, 2006).

Esta natureza cíclica das trombocitopenias e das parasitemias diminui com o tempo e com a cronificação da doença, o que resulta parasitemias esporádicas e trombocitopenias medianas (WOODY e HOSKINS, 1991). Megacariócitos ou qualquer outra célula precursora na medula óssea não apresentam inclusões durante a parasitemia (RIKIHISA, 1991). A presença de macroplaquetas no sangue é outro achado que pode-se apresentar tanto na fase aguda como na crônica da doença (HARVEY et al., 1978).

O prognóstico da TCC normalmente é favorável. Não obstante, o carrapato *R. sanguineus* também é transmissor de outros hemoparasitas, sendo possível encontrar infecções mistas, com *E. canis*, *A. platys*, *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii* e *Hepatozoon canis* ou associada a outras espécies de *Ehrlichia* (BREITSCHWERDT et al., 2002), potencializando a doença clínica e dificultando o diagnóstico e o manejo terapêutico dos cães doentes (SUKSAWAT et al., 2001).

### 2.1.7 PATOLOGIA CLÍNICA

Alterações patológicas clínicas causadas por *Ehrlichia/Anaplasma* em cães são muito inespecíficas, devido ao fato que outras doenças apresentam os mesmos sinais clínicos, os quais podem estar acometendo os cães infectados de forma isolada, ou em coinfeção com outros hemoparasitos (KUMAR et al., 2006). Diversas pesquisas têm demonstrado que esses agentes ocasionam alterações hematológicas, bioquímica sanguínea e outros exames

laboratoriais, e são de grande ajuda no diagnóstico, tratamento e recuperação do paciente (MACIERA et al., 2005; XAVIER, 2011 ; DE PADUA, 2014; HARRUS, 2015).

De forma geral, as alterações patológicas clínicas de maior frequência da erliquiose em cães incluem: anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, pancitopenia (fase crônica da doença), linfocitose, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e aumento da atividade sérica da alanina aminotransferase (MACIEIRA et al., 2005; NEER e HARRUS, 2006). Já nas infecções por *A. platys*, além de episódios cíclicos de trombocitopenia são observados quadros de anemia inconstante, macroplaquetas, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia (HARVEY et al., 1978; BRADFIELD et al., 1996; HARRUS et al., 1997a; MACIERA et al., 2005; XAVIER, 2011; PADUA, 2014). A EMH geralmente manifesta-se como uma doença moderada a severa e aproximadamente 65% dos pacientes são hospitalizados (CARPENTER et al., 1999; STANDAERT et al., 2000) com achados laboratoriais tais como, trombocitopenia, pancitopenia, leucopenia leve, linfocitose granular e elevação das aminotransferases hepáticas séricas que podem estar presentes na fase aguda. Já na fase crônica é comum observar estados de trombocitopenia, leucopenia e anemia mais grave (PADDOCK, 2003; RIKIHISA, 2015). A anemia se desenvolve em cerca da metade dos pacientes com EMH, acontecendo durante as duas primeiras semanas após o início da doença (FISHBEIN et al., 1994, STANDAERT et al., 1995, STANDAERT et al., 2000).

#### 2.1.7.1 Alterações Hematológicas nas infecções por *Ehrlichia/Anaplasma*

Diferentes pesquisas relatam alterações hematológicas nas infecções naturais e experimentais por *Ehrlichia/Anaplasma* em cães. Assarasakorn e Niwetpathomwat (2007), relataram quadros de anemia normocítica normocrômica, com valores diminuídos aos índices de referência de hematócrito, hemácias e hemoglobina, em cães coinfetados com *E. canis* e *Babesia canis*. Já Gaunt et al. (2010), relataram anemia e trombocitopenia mais severas em cães co-infetados simultaneamente com *E. canis* e *A. platys* quando comparados aos grupos infectados apenas por *E. canis* ou *A. platys*, sugerindo que a coinfeção pode exercer um papel de potencializador da infecção.

Em estudo realizado no Hospital Veterinário da UFMG demonstrou-se que 96,6% dos cães co-infetados por *E. canis* e *A. platys* apresentaram de eritrograma abaixo dos índices de referência. No mesmo estudo, 85,7% (6/7) dos cães infectados apenas por *A. platys*

apresentaram anemia macrocítica hipocrômica e valores de leucometria global dentro dos índices de referência (DE PADUA, 2014).

O tempo de incubação de *A. platys* varia entre uma a duas semanas. A fase aguda caracteriza-se por elevado número de plaquetas circulantes infectadas. Não obstante, alguns dias após, esses valores podem cair e ser menores que 20.000 plaquetas/ $\mu$ L. Neste período são poucas as possibilidades de encontrar o parasita no esfregaço sanguíneo. Após esta fase, o agente causal desaparece da circulação e a plaquetometria volta a índices próximos aos de referência em quatro dias. Em uma a duas semanas, ocorre uma nova parasitemia onde novamente, os valores plaquetários decrescem (HARRUS et al., 1997; GASPARNI et al., 2008). Embora a trombocitopenia seja um achado laboratorial frequente em infecções por *A. platys*, esta pode estar ausente em pacientes infectados ou estar relacionada a uma série de patologias inflamatórias (COSTA, 2011).

No Rio de Janeiro, Macieira et al. (2005), determinaram prevalência de *E. canis* de 32,1% em uma população trombocitopênica e 3,5% não trombocitopênicos. Entretanto, estes autores concluíram que a trombocitopenia não é específica para a detecção da infecção por *E. canis* e não deve ser utilizada apenas para estabelecer um diagnóstico de ehrlichiose canina, mesmo em uma área geográfica com prevalência de doença relativamente alta.

A trombocitopenia associada à bactéria *A. platys* é qualificada como regenerativa, pois é observada uma hiperplasia megacariocítica na medula óssea de cães infectados (BAKER et al., 1987). Essa trombocitopenia é causada pela proliferação do agente nas plaquetas, mas também pode envolver mecanismos imunomediados (NEER e HARRUS, 2006), sequestro esplênico e fagocitose plaquetária por macrófagos no baço, fígado e medula óssea (EDLLESTONE et al., 2007)

As citopenias de várias linhagens celulares são achados laboratoriais característicos do início do curso da doença causada por *Ehrlichia*, proporcionando importantes informações para o diagnóstico da doença (DUMLER et al., 2001). Beaufils et al. (2002), relataram variações hematológicas indicando leucocitose, devido a linfocitose e monocitose. Um quadro de leucopenia leve a moderada pode ser observada em 60-70% dos pacientes durante a primeira semana da doença acontecendo uma significativa redução nos valores da contagem absoluta de linfócitos (PADDOCK e CHILDS, 2003).

Castro et al. (2004), mediante infecção experimental em cães com *E. canis*, reportaram alterações hematológicas como: valores médios de hematócrito, hemácias e hemoglobina baixos ao longo do período de infecção, em comparação com o grupo controle. Observaram, ainda, que os valores leucocitários no grupo infectado foram significativamente mais baixos nas semanas 2 e 3 após a exposição. A contagem de eosinófilos do grupo infectado diminuiu a partir da segunda semana. Os animais infectados mostraram um aumento significativo nos valores dos neutrófilos e dos monócitos na semana 3, enquanto os linfócitos diminuíram significativamente. A contagem de plaquetas diminuiu, significativamente, nos cães infectados a partir da terceira semana até o final do estudo. Por outro lado, podem ser observados linfócitos atípicos e figuras de mitose que pode levar a confundir-se com um quadro de leucemia linfocítica diferenciada (WEISER et al., 1991; ALMOSNY, 2002).

#### 2.1.7.2 Alterações bioquímicas nas infecções por *Ehrlichia/Anaplasma*

Diversas alterações bioquímicas podem ser observadas nas infecções por *Ehrlichia/Anaplasma*. Diversos trabalhos relataram a importância de se avaliar órgãos vitais, como fígado, através da avaliação dos valores séricos da proteína plasmática total (PPT), bilirrubinas e níveis de transaminases e fosfatase alcalina, assim como as dosagens de uréia e creatinina séricas avaliando a função renal, uma vez que estas refletem o progresso da doença para um processo multissistêmico (EVERETT et al., 1994; FISHBEIN et al., 1994; STANDAERT et al., 1995; HARRUS et al., 1997; NUTT e RAUFMAN, 1999; ALMOSNY e MASSARD, 2002; BRANDÃO e HAGIWARA, 2002; CASTRO et al., 2004; LITTLE, 2010; XAVIER, 2011).

Em um estudo realizado no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí (HVU-UFPI) e clínicas particulares da cidade de Teresina, PI em cães infectados por *E. canis* e *A. platys*, Silva et al. (2010), descreveram como principais achados hematológicos nos animais infectados só com *E. canis* quadros de trombocitopenia e anemia em 75% (18/24) e 62,50% (15/24) dos cães, respectivamente. Esses autores também relataram leucocitose com neutrofilia em 33,33% (8/24) dos animais. Quanto aos parâmetros bioquímicos analisados por eles, as alterações comumente encontradas foram hiperproteinemia 91,67% (22/24), hiperglobulinemia 87,50% (21/24), hipoalbuminemia e níveis elevados de uréia em 25,00% (6/24) dos cães infectados. No mesmo estudo, considerando os cães infectados só por *A. platys*, os principais achados hematológicos e bioquímicos foram: trombocitopenia em 41,67% (20/48) dos cães, anemia em 37,50%

(18/48), leucocitose com neutrofilia em 27,08% (13/48), hiperproteinemia 81,25% (39/48), hiperglobulinemia 70,83% (34/48), hiperalbuminemia, 43,75% (21/48), aumento nas concentrações séricas de uréia e creatinina 31,25% (15/48) e hipoalbuminemia, 18,75% (9/48).

Entre outras alterações podem ser observados valores elevados de creatinina sérica e nas atividades séricas de lactato desidrogenase, amilase e creatina fosfoquinase. Anormalidades eletrolíticas como hipocalcemia, hipomagnesemia e hipofosfatemia também são observadas. Foram relatados baixos valores de sódio, observando-se quadros de hiponatremia ligeira a moderada em 50% dos pacientes adultos e até um 70% nos pacientes pediátricos (EVERETT et al., 1994; JACOBS e SCHUTZE, 1997). A fisiopatologia responsável por estas alterações nos eletrólitos ainda é desconhecida (DUNN et al., 1992; EVERETT et al., 1994; JACKSON e JACKSON, 1997; PADDOCK et al., 2001). Em alguns pacientes, foram observados valores séricos de albumina reduzidos, podendo afetar a avaliação dos níveis de cátions bivalentes no soro (HARKESS et al., 1990; JACKSON e JACKSON, 1997).

Em estudo experimental em cães, Castro et al. (2004), relataram valores significativamente diminuídos de PPT na terceira semana após a infecção com *E. canis*. Já Unver et al. (2009), também mediante infecção experimental em um cão de raça beagle, relataram uma diminuição da PPT (5,0 g / dL ) e níveis de hemoglobina. Esses achados poderiam ser consequência da alteração do metabolismo protéico no fígado, devido a danos nos tecidos e supressão da medula óssea. A necrose do fígado pode diminuir o valor de proteínas plasmáticas e pressão osmótica coloidal a qual pode eventualmente ser o motivo do edema na EMC.

Já na fase crônica, segundo Almosny (1998), hipoalbuminemia associada a hiperglobulinemia é o achado mais freqüente em cães infectados com *E. canis*. A mesma autora relatou que valores elevados de uréia sérica, sem aumento nos de creatinina, apontam para uma possível causa pré-renal, como desidratação em função de febre ou por um estresse sistêmico determinado pela doença, podendo levar ao aumento do catabolismo protéico e não por causa renal ou pós-renal.

A hiperglobulinemia (hipergamaglobulinemia) também é relatada como um achado bioquímico freqüente em cães infectados com *E. canis* (HARRUS et al., 1996b; HARRUS

et al., 1999; CASTRO et al., 2004; LITTLE 2010). Este achado laboratorial é resultado de uma resposta imune celular ineficaz e à persistência da *Ehrlichia* no interior de células hospedeiras, gerando uma reação inflamatória hipersensível ou uma resposta autoimune (SWANGO et al., 1989). A diminuição da albumina pode atuar como um mecanismo compensatório do estado de hiperglobulinemia, tentando manter a pressão oncótica, e evitando o aumento da viscosidade do sangue (WOODY e HOSKINS, 1991). Já na anaplasiose canina pode-se observar elevação nos valores da PPT, com aumento de globulinas, hipergamaglobulinemia, associada com altos níveis de de IgM e IgA (HARRUS et al., 1997; ALMOSNY e MASSARD, 2002; LITTLE, 2010)

## 2.1.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### 2.1.8.1 Microscopia Óptica

A observação de hemoparasitos nas formas de mórulas ou de corpúsculos elementares, pela microscopia nos preparados corados por métodos de Romanowsky vem sendo usada para diagnosticar hemoparasitoses na rotina. Porém, o achado em sangue periférico ocorre somente na fase aguda e requer uma avaliação sistemática, cuidadosa e demorada, e por isso apresenta baixa sensibilidade e frequentes falsos negativos (NEER, 1998).

Infelizmente a visualização das mórulas, muitas vezes é dificultada, por consumir muito tempo, em média 40 a 60 minutos, dependendo da experiência do patologista, tendo uma taxa de êxito cerca de 4% (HARRUS e WANER, 2011). Esfregaços feitos com sangue capilar (ponta de orelha), capa leucocitária e aspirados de linfonodos apresentam sensibilidade maior, podendo ser utilizados para aumentar as chances de encontrar as mórulas (MYLONAKIS et al., 2003).

Não obstante, as mórulas devem ser diferenciadas das outras estruturas intracitoplasmáticas. Portanto, um dos obstáculos do diagnóstico microscópico é saber diferenciar as estruturas observadas, como precipitados de corantes, artefatos sobre os leucócitos e de outros possíveis parasitos (NEITZ e THOMAS, 1938). É por isso, a importância de conhecer a ocorrência na região dessas espécies e seus vetores, para indicar a necessidade do diagnóstico molecular para diferenciá-las. Além disso, o esfregaço sanguíneo é importante para avaliar a ocorrência de coinfeção e ainda, alterações celulares como, eritrofagocitose, fagocitose de material nuclear, trombofagocitose, megaloplaquetas e monócitos ativados (HARRUS e WANER, 2011).



### 2.1.8.2 Sorologia

#### 2.1.8.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A RIFI é o método mais utilizado para o diagnóstico de infecção por *E. canis* e é considerada o "padrão ouro" (WARNER et al., 2001). No entanto, ele só pode ser realizado em laboratórios especializados, a leitura dos resultados é subjetiva, e não diferencia entre *E. canis*, *E. chaffeensis*, e infecções por *E. ewingii* em cães, uma vez que estas espécies estão intimamente relacionadas e têm alguns antígenos de reação cruzada (BREITSCHWERD et al., 1998).

A RIFI não apresenta reação cruzada entre *A. platys* e *E. canis* e, embora seja altamente específica (FRENCH e HARVEY, 1983; WANER et al., 2001), não pode ser descartada a possibilidade de uma coinfeção. Deve-se, ainda, levar em consideração que a presença de anticorpos contra qualquer espécie da Família Anaplasmataceae indica apenas que o indivíduo foi exposto ao agente, sendo possível que o mesmo não esteja infectado (HARRUS e WANER, 2011).

A detecção sorológica é baseada na identificação de IgG e IgM no soro dos pacientes. A técnica de RIFI para IgG é negativa em 80% dos pacientes durante a primeira semana de doença, e os níveis de IgM também pode ser pouco significativos neste momento. É importante obter uma amostra de soro na fase de convalescença (3-6 semanas), uma vez que a maioria dos pacientes (> 80%) foram diagnosticados por RIFI a partir de 6 semanas pós-infecção (CHILDS et al., 1999).

A soroconversão com um aumento de quatro vezes ou mais do título do anticorpo entre amostras de fase aguda e de convalescência, são resultados de confirmação da presença de erliquiose. As recomendações para o diagnóstico da EMH em um paciente com doença compatível, inclui um título maior ou igual a 1: 256 que é suficiente para confirmar a doença, e um título de 1:64 como indicativo de provável EMH (WALKER, 2000).

#### 2.1.8.2.2 Testes comerciais de Ensaio Imunoenzimático Indireto

Diferentes testes comerciais sorológicos para detecção de anticorpos imunoglobulina G (IgG) contra *E. canis*, têm sido desenvolvidos e lançados no mercado. A interpretação dos resultados, destes testes é qualitativo, comparados com outros testes sorológicos como RIFI. Não obstante, Harrus et al., (2002) não observaram diferença significativa entre a RIFI e os testes comerciais “recombinant major antigenic protein 2” (rMAP2)-ELISA, the Immunocomb1 (Biogal, Israel) e o Snap1 3Dx assay (IDEXX Laboratories Inc., USA). Estes autores concluíram que os testes comerciais demonstraram ser altamente específicos na detecção de anticorpos anti-*E. canis* .

Por outro lado, Ferreira et al, (2009) avaliaram um teste comercial de ELISA (IDEXX®) para detecção de anticorpos de *A. phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, e *E. canis*; e antígenos de *Dirofilaria immitis* para verificar a possibilidade de reação cruzada de *A. platys* com *A. phagocytophilum*, informada pelo fabricante. Neste estudo foram avaliadas 16 amostras de soro de cães PCR-positivos para *A. platys* e apresentando inclusões em plaquetas. Os autores não relataram reação cruzada entre *A. phagocytophilum* e *A. platys*, relatada pelo fabricante do kit ELISA, uma vez que animais positivos para *A. platys* não apresentaram, na fase aguda, níveis de anticorpos detectáveis pelo kit.

Cabe ressaltar que um resultado negativo para estes testes comerciais, não significa ausência do microrganismo, pois o animal pode ainda não ter produzido anticorpos do tipo IgG ou pode não ser imunocompetente, isto é, não conseguir produzir quantidade suficiente de anticorpos detectáveis (SUKSAWAT et al., 2001).

### **2.1.8.3 Diagnóstico Molecular**

Dentre as técnicas moleculares para o diagnóstico de ehrlichiose, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais utilizada. A técnica de PCR é usada de forma complementar junto com as técnicas sorológicas para diagnóstico da doença. Wen et al. (1997) indicaram a utilização da PCR junto a testes de imunofluorescência indireta para auxílio no diagnóstico da infecção inicial ou avaliação do tratamento.

Na fase inicial da doença o diagnóstico molecular parece ser o mais específico e confiável para a detecção de organismos, mas também apresenta limitações. Assim, a extrema sensibilidade desses testes pode facilmente levar a resultados falsos positivos devido

à contaminação (SELLON, 2003). Além disso, ampliações inesperadas podem ocorrer, por exemplo: os iniciadores baseados na seqüência 16S rRNA para *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Família Anaplasmataceae) amplificam também outros gêneros da mesma família como *Wolbachia*, explicando o fato de que cães com microfilariose apresentam resultados falsos positivos. Estes não seriam identificados sem o sequenciamento (LITTLE, 2010; XAVIER et al., 2015).

Existem vários protocolos para as diferentes espécies da Família Anaplasmataceae, e são baseados em alvos distintos do genoma como, por exemplo, os genes 16S rRNA, *p28*, *p30*, *dsb* e *virB9*, sendo que 16S rRNA e o *p30* são os mais comumente usados (HARRUS e WANNER, 2011). Para *A. platys* também são usados *gltA* (AGUIRRE et al., 2006), *GroEL* (ABARCA et al., 2007; BEALL et al., 2008) além do 16S RNAr (AGUIRRE et al., 2006; ABARCA et al., 2007; BEALL et al., 2008).

O gene 16S rRNA tem sido o alvo molecular para o diagnóstico principal de infecções para as espécies da família Anaplasmataceae, porque estas seqüências de genes são altamente conservadas ao longo do tempo e vem sendo realizadas comparações a nível molecular entre as diversas espécies desta família. Além disso, este gene também tem sido o mais amplamente utilizado para identificar DNA de *E. chaffeensis* em carrapatos e reservatórios vertebrados (ANDERSON et al., 1993; LOCKART et al., 1998; KOCAN et al., 2000).

A PCR pode ser uma alternativa rápida aos outros métodos de diagnóstico existentes. Isto porque os problemas apresentados nos métodos convencionais, como sensibilidade inadequada e dificuldade com o diagnóstico diferencial, são superadas pela tecnologia da PCR. Somado a isso, a extração de ácido nucléico a partir do sangue total é mais rápida e menos laboriosa do que o isolamento de leucócitos antes da extração (FENOLLAR e RAOULT, 2004).

## **2.2 PIROPLASMOSE EM CÃES**

### **2.2.1 ETIOLOGIA DA PIROPLASMOSE EM CÃES**

A organização genotípica dos piroplasmas responsáveis por infectar cães resultou no aparecimento de múltiplas e novas espécies, sendo elas sete, nominadas pela sua morfologia

como grandes espécies (2 x 5 µm) e seis de pequenas espécies (0,8 a 1,2 x 3,2 µm) (SHAW e DAY, 2005).

Dentro das grandes espécies, *Babesia canis* foi dividida em três subtipos de *B. canis*: *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* (UILENBERG et al., 1989). Não obstante, considerando dados como: imunidade cruzada, provas sorológicas, especificidade do vetor e filogenia molecular, estes subtipos foram reclassificados e atualmente são consideradas outras espécies de *Babesia*. *Babesia canis*, reportada, principalmente, em cães na Europa e é transmitida por *Dermacentor* spp, *Babesia vogeli*, transmitida por *R. sanguineus*, reportada especialmente, em países tropicais, subtropicais e mediterrâneos (BECK et al., 2009) e *B.rossi*, relatada na África e transmitida por *Haemaphysalis elliptica* (IRWIN, 2009).

Em 2004 foi identificada uma nova grande espécie de *Babesia* na América do Norte, nomeada de *Babesia* sp. Este piroplasma foi detectado em um cão, tanto no sangue quanto na medula óssea, com anormalidades clínicas e hematológicas consistentes com babesiose (BIRKENHEUER et al., 2004). A quinta espécie, capaz de infectar o cão doméstico, foi relatada em um cão da Grã-Bretanha que havia estado fora desse país. O isolado desta espécie, demonstrou uma similaridade genética de 94% com *B. vogeli*. O cão morreu como resultado da infecção e o vetor não foi identificado (HOLM et al., 2006). Já na Croácia, Beck et al. (2009), em um estudo realizado em cães nas regiões costeiras desse país, identificaram *B. caballi* em um cão, sugerindo que novas espécies ou subespécies podem ser descobertas em diferentes hospedeiros, particularmente na presença de apresentações clínicas atípicas. E por último, a sétima grande espécie de piroplasma responsável por infectar cães, identificada como *Rangelia vitalii*, foi reportada em algumas regiões da América do Sul: Argentina, Uruguai e regiões Sul e Sudeste do Brasil (LORETTI e BARROS, 2005; LEMOS et al., 2012; EIRAS et al., 2014; SOARES et al., 2015).

As espécies consideradas morfologicamente pequenas capazes de infectar os cães, abrangem *B. gibsoni* (ZAhLER et al., 2000) , que apesar de ter sido reportada em diferentes regiões do mundo, vem mostrando uma alta frequência na Ásia (LEE et al., 2009) e na região sudeste da Austrália (JEFFERIES et al., 2003), sendo o vetor *Haemaphysalis longicornis*; enquanto a *B. conradae*, reportada na Califórnia, Estados Unidos. A distribuição geográfica deste pequeno piroplasma encontra-se limitada nessa região. Além disso, o vetor é ainda desconhecido. Entretanto, já foi demonstrada a transmissão transestadial por *R. sanguineus*, (KJEMTRUP e CONRAD, 2006); e *Babesia microti*-like, também conhecida como *Theileira*

*annae*, é considerada como endêmica na região norte da Espanha (CAMACHO et al., 2001; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; CAMACHO-GARCIA, 2006) sendo o carrapato *Ixodes hexagonus* como o principal vetor (IRWIN, 2009). Entretanto, já foi reportado em *I. ricinus* e *R. sanguineus* na Itália e Espanha (CASSINI et al., 2009; LLEDÓ et al., 2010).

### 2.2.2 TAXONOMIA

Filo: Apicomplexa

Classe: Sporozoazida

Ordem: Piroplasmida

Família: Babesiidae

Gênero: *Babesia*

*Rangelia*

Família: *Theileriidae*

Gênero: *Theileria*

Figura 6: Representação da classificação sistemática dos Protozoários da Ordem Piroplasmida. Adaptado: VIAL e GORENFLOT, 2006

### 2.2.3 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo do agente se inicia quando o carrapato infectado, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula no cão, esporozoítas presentes nas glândulas salivares (UILENBERG, 2006). Já na corrente sanguínea, esses esporozoítas aderem-se à membrana do eritrócito e, por endocitose invadem os eritrócitos, iniciando uma multiplicação intracelular acelerada (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998).

Essa reprodução assexuada resulta na formação dos merozoítos levando à destruição das células parasitadas, com liberação dos parasitas e imediata invasão e destruição de outros eritrócitos (VIAL e GORENFLOT, 2006). Um pequeno percentual de merozoítos não entra em divisão e tornam-se grandes gamontes esféricos, os quais permanecem dentro dos eritrócitos (MACKENSTEDT et al., 1990). Durante o repasto sanguíneo no cão parasitado, o carrapato se infecta pela ingestão de sangue que contém diversos estágios evolutivos do piroplasma, porém unicamente os gamontes atingem o intestino do carrapato virando gametócitos (NEVES, 2000). Após a fusão dos gametas, masculino e feminino, estes darão origem aos zigotos, os quais por um processo de reprodução assexuada, chamada de esporogonia, produzirão cinetos móveis. Essas formas evolutivas atravessam a parede intestinal, tornando-

se esporocinetos. Estes invadem a hemolinfa do artrópode e migram para diversos órgãos do carrapato, incluindo as glândulas salivares e ovários. Nas glândulas salivares, os esporocinetos darão origem a milhares de esporozoítos. Os esporocinetos, presentes nos ovários da fêmea, infectarão as larvas oriundas de ovos infectados (O'DWYER e MASSARD, 2002; VIDOTTO e TRAPP, 2004).

#### 2.2.4 EPIDEMIOLOGIA DA PIROPLASMOSE EM CÃES

A distribuição geográfica dos agentes causadores de babesiose canina está diretamente relacionada à distribuição dos vetores ixodídeos e os relatos das incidências, prevalências e das alterações clínico patológicas causadas pelas diferentes espécies da Ordem Piroplasmida que infectam o cão, tem grande importância médica e epidemiológica (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011). Diferentes estudos, aplicando técnicas de microscopia óptica, sorológicas e moleculares têm demonstrado grande dispersão de infecção por piroplasmas em cães em diferentes países da América do Sul e em outras regiões do mundo (Quadro 6).

**Quadro 6.** Distribuição geográfica dos agentes causadores de piroplasmose canina

Tamanho	Especie	Vetor	Distribuição geográfica
Grande	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Regiões tropicais e subtropicais
	<i>Babesia canis</i>	<i>Dermacentor spp</i>	Europa e Ásia
	<i>Babesia rossi</i>	<i>Haemaphysalis elliptica</i>	África
	<i>Babesia sp.</i>	Desconhecido	Estados Unidos
	<i>Rangelia vitalii</i>	<i>Amblyomma aureolatum</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	América do Sul
Pequena	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Ásia, África, Europa, e América do Sul
	<i>Theileria annae</i>	<i>Ixodes hexagonus</i>	Espanha e Portugal
	<i>Theileria sp.</i>	Desconhecido	África do Sul
	<i>Theileria sp.</i>	Desconhecido	África, Europa, Ásia
	<i>Theileria equi</i>	Desconhecido	África, Europa, Ásia

Fontes: adaptado de IRWIN, 2009; SOARES et al., 2015.

A maioria dos casos de babesiose canina acontecem nos períodos de maior atividade dos vetores artrópodes transmissores como o ixodídeo *D. reticulatus* que apresenta uma maior atividade entre os meses de novembro a março, no hemisfério Sul (SANTOS-SILVA et al, 2009) e *R. sanguineus* cujas formas adultas também apresentam maior atividade nos meses mais quentes (SILVA et al., 2006). No entanto, alguns estudos demonstraram que,

devido às recentes mudanças nos ecossistemas, a atividade dos ixodídeos vem ocorrendo durante o ano inteiro (CARDOSO et al., 2010; FERREIRA, 2008).

Acredita-se que o principal vetor da babesiose canina em regiões urbanas seja *R. sanguineus* (SHAW et al., 2001). Este ixodídeo, apesar de sua baixa antropofilia, tem importância para saúde pública, pois é capaz de transmitir diversos patógenos ao humano (PALMAS et al., 2001; DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006). Devido à natureza cosmopolita do vetor *R. sanguineus*, *B. vogeli* tem uma ampla distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, e se estende em latitudes mais frias onde pode ser confundido com outras espécies das grandes Babesias, sendo encontrada em todos os continentes (JEFFERIES et al., 2003; MATJILA et al., 2004; BIRKENHEUER et al., 2005; MATJILA et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2008; VARGAS-HERNANDÉZ et al., 2012).

*Babesia canis (sensu strictu)* é transmitida por *Dermacentor* spp. e tem sido reportada, maiormente, em toda a Europa Central: Áustria (KIRTZ et al., 2012), Croácia (CACCIO et al., 2002; BRKLJACIĆ et al., 2010), França (CACCIO et al., 2002; BOURDOISEAU, 2006), Alemanha (HAMEL et al., 2012), Hungria (FÖLDVÁRI et al., 2005), Itália (SOLANO-GALLEGO et al., 2008), Holanda (MATJILA et al., 2005), Polônia (ADASZEK e WINIARCZYK, 2008), Portugal (CARDOSO et al., 2008), Suíça (PORCHET et al., 2007), Eslovênia (DUH et al., 2004), Espanha (CRIADO-FORNELIO et al., 2007; TABAR et al., 2009), Suíça (SAGER et al., 2005) e Noruega (OINES et al., 2010). *Babesia rossi*, originalmente reconhecida apenas na África do Sul, tem sido relatada recentemente em outras regiões do continente africano, incluindo a Nigéria e o Sudão, onde os carrapatos vetoriais são *Haemaphysalis* spp. (OYAMADA et al., 2005; SASAKI et al., 2007 ; IRWIN, 2009) e América do sul (Quadro 7).

A infecção por *R. vitalli* tem sido relatada em cães (SPAGNOL et al., 2003). Não obstante, sabe-se que a infecção por *R. vitalli*, ocorre principalmente nas regiões rurais e que *A. aureolatum* é o principal vetor desse patógeno nessas áreas (SPAGNOL et al., 2003). Além disso, sabe-se também que tanto larvas, ninfas e adultos de *A. aureolatum* alimentam-se em diferentes tipos de hospedeiros incluindo animais silvestres (GUGLIELMONE et al., 2003). De tal modo, acredita-se que animais selvagens infestados por *A. aureolatum* funcionariam como reservatórios sem adoecer ou desenvolvendo apenas a forma leve da doença (LORETTI e BARROS, 2005).

**Quadro 7.** Prevalências de espécies de piroplasmas em cães domésticos na América do Sul .

Local	Positivos	Teste	Agente	Autor(es)
<b>Argentina</b>				
Buenos Aires	2*	PCR	<i>B. vogeli</i>	Eiras et al. (2008)
Misiones	1+	Nested e RFLP	<i>R. vitalii</i>	Eiras et al. (2014)
<b>Brasil</b>				
Bahía	33,95%(2.459/7.243)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp.	Ungar et al. (2007)
Brasília	10,7%(20/187)	PCR e RFLP	<i>B. vogeli</i>	Vasconcelos (2010)
	0,5%(1/187)	PCR e RFLP	<i>Babesia rossi</i>	
Espírito Santo	23,5%(20/85)	PCR	<i>Babesia</i> spp.	Spolidorio et al. (2010)
	36,5% (31/85)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	
Goiás	48,6%(17/35*)	PCR	<i>B. vogeli</i>	Duarte et al. (2011)
Maranhão	3,33% (10/300)	PCR	<i>B. vogeli</i>	Silva et al. (2012)
Mato Grosso	60,0% (6/10*)	PCR	<i>B. vogeli</i>	Spolidorio et al. (2011)
Minas Gerais	1,9%(1 /55)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp	Soares et al. (2006)
	42,0%(61/145)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp.	Bastos et al. (2004)
	26,9%(28/104)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp.	Rodrigues et al. (2002)
	66,9%(85/127)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	Ribeiro et al. (1990)
		PCR	<i>B. vogeli</i>	Passos (2004)
Paraíba	10,0%(10/100)	PCR	<i>B. vogeli</i>	Rotondano (2014)
Paraná	35,7%(136 /381)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	Trapp et al. (2006)
Pernambuco	57.9%(234/404)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	Araujo et al. (2015)
Rio de Janeiro	4,0%(20/500)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp.	Guimarães et al. (2004)
		PCR	<i>B. vogeli</i>	Sa (2006)
	11.90% (37/311)	PCR e RFLP	<i>B. vogeli</i>	Vilela et al. (2013)
	1,4%(5/336)	PCR e RFLP	<i>B. vogeli</i>	Ribeiro et al. (2014)
	5,2%(13/250)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp.	O'Dwyer et al. (2001)
	6,8%(7/103)	PCR e RFLP	<i>R. vitalii</i>	Lemos et al. (2012)
Rio grande do Sul		Imunohistoquímica	<i>R. vitalli</i>	Loretti e Salles (2005)
Sao Paulo	42,4%(45/106)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	Dell'Porto et al. (1993)
	10,3%(11/106)	Microscopia	<i>Babesia</i> spp.	
<b>Colombia</b>				
Bogotá	4,7%(1/21)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	Vargas-Hernández et al.(2012)
Villavicencio	58%(18/31)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	
	9,7%(3/31)	PCR	<i>B. vogeli</i>	
Bucaramanga	71,7%(28/39)	RIFI	<i>B. vogeli</i>	
	5,1%(2/39)	PCR	<i>B. vogeli</i>	
<b>Venezuela</b>				
Falcón	2,2%(3/134)	PCR	<i>B. vogeli</i>	Criado-Fornelio et al. (2007)
<b>Uruguai</b>				
Salto	1+*	PCR	<i>R. vitalii</i>	Soares et al. (2015)
Treinta y Tres	1+*	PCR	<i>R. vitalii</i>	

\* amostras positivas por Microscopia óptica, + cães com sinais clínicos compatíveis para babesiose canina.



Dentro dos pequenos piroplasmas, maior distribuição geográfica e, que acometem aos cães é, sem dúvida, *B. gibsoni*. A espécie tem sido reportada em diferentes países do Sul, Leste e Sudeste do continente Asiático, extremo leste da África, alguns casos nos EUA, América do Sul, e raramente na Europa (IRWIN, 2009). A distribuição geográfica desses organismos é delineada em grande parte pela distribuição geográfica do carrapato vetor. Curiosamente, essa generalização parece não se aplicar ao protozoário *Babesia gibsoni*. Nos últimos 10 anos as infecções por *B. gibsoni* têm sido relatadas em muitos países fora da Ásia, predominantemente em cães American Pit Bull Terrier, e há evidências convincentes de que estes casos surgiram devido à mordida e luta entre cães infectados com outros não infectados (BIRKENHEUER et al., 2005; YEAGLEY et al., 2009).

Apesar do piroplasma *B. microti*-like (*Theileria annae*) ser endêmico na Galiza, noroeste da Espanha (CAMACHO-GARCÍA, 2006), há relatos de infecção em cães clinicamente saudáveis em Tarragona ao nordeste da Espanha (TABAR et al., 2009), Croácia (BECK et al., 2009) e EUA (YEAGLEY et al., 2009). O DNA de *B. microti*-like foi, também, detectado em raposas da região central e norte da Espanha (CRIADO-FORNELIO et al., 2004), do leste do Canadá (BIRKENHEUER et al., 2010) e da Croácia (DEZDEK et al., 2010) assim como em gatos em Portugal (CRIADO-FORNELIO et al., 2003a) e na Itália (PENISSI et al., 2007) e, também, em carrapatos *I. ricinus* e *R. sanguineus* na Itália (CASSINI et al., 2009; IORI et al., 2010); em *I. ricinus* e *I. hexagonus* no norte da Espanha (LLEDÓ et al., 2010). Até a data atual, esta espécie de piroplasma não foi relatada na África ou na Austrália.

Estudos moleculares relataram infecção por *Theileria equi*, *T. annulata* e *B. caballi*, em cães na Espanha (CRIADO-FORNELIO et al., 2007), Croácia (BECK et al., 2009) e França (FRITZ, 2010).

Pouco se sabe sobre os possíveis fatores de risco da babesiose canina (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006a). Alguns estudos demonstraram que não existe relação significativa de raça ou sexo com a infecção (GUIMARÃES et al., 2002; BASTOS et al., 2004; COSTA-JÚNIOR et al., 2009). Porém, Dantas-Torres e Figueredo (2006), observaram maior frequência em cães com idade superior a dois anos. Em outro estudo realizado com cães de população hospitalar oriundos de áreas urbanas demonstrou-se uma soropositividade para *B. vogeli* maior em cães adultos (TRAPP et al., 2006). Por outro lado, não foram

observadas associações significativas considerando as variáveis de gênero e raça (RIBEIRO et al., 1990; GUIMARÃES et al., 2002; BASTOS et al., 2004; TRAPP et al., 2006). Costa-Júnior et al. (2009), em um estudo sobre a soroprevalência em cães na zona rural de Minas Gerais, relataram que tanto raça, sexo e volume globular abaixo de 30% não constituíram fatores de risco relacionados à soroprevalência de *B. vogeli*.

### **2.2.5 Imunopatogenia da piroplasmose em cães**

A babesiose é uma doença multissistêmica (JACOBSON, 2006) cuja patogenia envolve manifestações que não podem ser explicadas diretamente só pela hemólise, ao parecer, também são resultado tanto das repostas inata e adaptativa como da produção de citocinas do hospedeiro ao parasita, com desenvolvimento subsequente de uma disfunção múltipla de órgãos (BOOZER e MACINTIRE, 2003; TABOADA e LOBETTI, 2006; MATIJATKO et al., 2010).

A severidade da doença depende de fatores como: presença de co-infecções, faixa etária do hospedeiro, estado imunitário do cão, e grau de resposta imune desenvolvida (BOOZER e MACINTIRE, 2003; IRWIN, 2005; TABOADA e LOBETTI, 2006; IRWIN, 2009). Entretanto, a capacidade do sistema imune de eliminar completamente o agente é limitada, tornando eles, na maioria das vezes, portadores crônicos após da recuperação clínica (TABOADA e LOBETTI, 2006). Nestes casos, em cães que vivem em regiões endêmicas a infecção crônica pode ser favorável ao conferir proteção contra doença futura. Porém, isso mantém o risco de desenvolver reincidência da doença clínica caso aconteça posteriormente algum comprometimento imunológico (BRANDÃO et al., 2003; IRWIN, 2009).

Após o aumento do número de parasitas no interior dos eritrócitos, rompimento e invasão de novas hemácias, resultado da multiplicação intracelular acelerada do parasita nos eritrócitos, os antígenos parasitários são exibidos na superfície da membrana celular eritrocitária, induzindo opsonização e remoção das hemácias infectadas pelo sistema monocítico fagocitário (SMF). Anticorpos anti-membrana eritrocitária são produzidos em níveis elevados e podem causar um quadro de anemia hemolítica imunomediada (AHIM) (TABOADA e LOBETTI, 2006). Entretanto, pesquisas mostraram ausência de AHIM na

infecção por *B. canis*, diferentemente daquelas ocasionadas por *B. gibsoni* e, possivelmente, *B. vogeli* (CARLI et al., 2009). Além disso, não existe imunidade cruzada entre *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi* (UILENBERG, 2006).

Acredita-se que hemólise intravascular no início da infecção pode ser originada pela ação mecânica de *B. canis* nos eritrócitos parasitados (BOUNOUS et al., 1993).

A ocorrência de uma hemólise intensa resulta na liberação de hemoglobina (Hb), provocando hemoglobinemia e, consequente, hemoglobinúria e bilirrubinemia (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002). Níveis elevados da fração indireta da bilirrubina, leva à sobrecarga hepática, surgindo icterícia, agravada pela estase biliar e pelas hepatopatias resultantes (O'DWYER e MASSARD, 2002). Além disso, a hipóxia anêmica decorrente da hemólise leva ao incremento do metabolismo anaeróbico, estabelecendo um quadro de acidose metabólica com desenvolvimento subsequente de alcalose respiratória compensatória, o que contribui para uma disfunção múltipla de órgãos (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002; TABOADA e LOBETTI, 2006).

Os agentes infecciosos induzem a produção de vários mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos teciduais, monócitos, mastócitos, células endoteliais, plaquetas e outros elementos celulares. Destes mediadores, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) e IL-6 são os mais conhecidos. IL-4 e IL-10 desativam a produção de monócitos / macrófagos de TNF-  $\alpha$ , IL-1 e IL-6, mediadores da resposta celular. Entretanto, os eventos iniciais na resposta inflamatória também induzem a produção de cortisol, outro potente mediador anti-inflamatório. Através da ação combinada desses mecanismos a resposta inflamatória na fase aguda leva à resolução da infecção (NYSTROM, 1999).

Estudos de infecção experimental por *B. gibsoni*, relataram a produção de superóxido, que conduz à peroxidação lipídica (MORITA et al., 1995). A peroxidação lipídica dos eritrócitos diminui a flexibilidade da membrana dos glóbulos vermelhos, resultando numa passagem mais lenta dos glóbulos vermelhos ao passarem nos leitos capilares. Esta passagem lenta nos capilares, em combinação com proteases parasitas solúveis, conduz à produção de proteína do tipo fibrinogênio. Esta proteína induz a agregação eritrocitária, provocando estase vascular, o que leva ao desenvolvimento de isquemia, trombose e danos, principalmente, ao

sistema nervoso central (SNC), rins e músculos (JACOBSON e LOBETTI, 1996; LOBETTI et al., 1996; AYOUB et al., 2010).

Nos processos hemolíticos graves são produzidos mediadores inflamatórios de ação sistêmica, causando vasodilatação periférica e hipotensão (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002), que facilitam a interação entre eritrócitos infectados e o tecido endotelial (SCHETTERS et al., 1998), levando à agregação de eritrócitos (VALLI, 2007). Além disso, há produção de mediadores de ação tóxica, como o óxido nítrico, contribuindo na vasodilatação em quadros hipotensivos de babesiose canina complicada (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002).

Os principais sinais clínicos relatados nesta doença são causados pela anemia hemolítica e pela resposta inflamatória sistêmica, com desenvolvimento subsequente da síndrome da disfunção múltipla de órgãos (SDMO) (BOOZER e MACINTIRE, 2003; TABOADA e LOBETTI, 2006). O quadro clínico ocasionada por *B. rossi*, tende a ser mais severo, podendo-se desenvolver hipóxia, choque hipotensivo com coagulação intravascular disseminada (CID), resposta Inflamatória Sistêmica e SDMO (WELZL et al., 2001).

#### **2.2.6 Achados clínicos e laboratoriais da piroplasmose em cães**

O quadro clínico de uma infecção por *Babesia* spp. nos cães pode evoluir de forma hiperaguda, aguda ou crônica, ou ter ainda uma forma subclínica (TABOADA e LOBETTI, 2006), ocasionando desde uma infecção sem manifestação clínica até quadro clínico grave, podendo provocar a morte do paciente (MAIA, 2005). Estes diferentes níveis de severidade, estão geralmente associados à faixa etária do hospedeiro, coinfeção com outros patógenos, histórico de alta infestação por carrapatos, intensa parasitemia, e resposta inflamatória sistêmica severa com desenvolvimento subsequente de disfunção multi-orgânica (LEISEWITZ et al., 2001; TABOADA e LOBETTI, 2006; SCHNITTGER, 2012).

A forma hiperaguda é rara e está associada com choque hipotensivo, hipóxia, dano tecidual, estase vascular e uma taxa de mortalidade elevada (LEISEWITZ et al., 2001). Já a fase aguda é caracterizada por febre intermitente, vômito, anorexia, edema, fraqueza, esplenomegalia, linfadenomegalia, trombocitopenia, hemoglobinúria, petéquias e icterícia

(FURLANELLO et al., 2005). A maioria dos cães adultos conseguem se recuperar desta fase, com a terapêutica apropriada, porém podem ficar como portador persistente, conservando uma baixa parasitemia, sem detecção do agente na microscopia óptica (TODOROVIC, 1975), podendo apresentar sinais de recorrência da doença, quando desafiados a condições imunossupressoras ou coinfeção com outros agentes (FURLANELLO et al., 2005)

Apesar dos sinais clínicos e achados laboratoriais da infecção por *B. gibsoni* serem parecidos aos de *B. canis*, Fukumoto et al. (2003), relataram que infecções causadas por *B. gibsoni*, podem desenvolver um quadro de AHIM pela produção de anticorpos anti-membrana eritrocitária, os quais podem se detectar pelo teste de Coombs. Entretanto, é importante fazer o diagnóstico diferencial entre a forma aguda de babesiose canina e outras causas de AHIM e lúpus eritematoso sistêmico, indicando assim uma terapêutica adequada (IRWIN e HUTCHINSON, 1991; TABOADA e LOBETTI, 2006; AYOUB et al., 2010).

A forma subclínica é possivelmente a de maior importância e apresentação nos cães com babesiose (VIDOTTO e TRAPP, 2004), já que nesta fase, os cães não apresentam manifestações clínicas ao exame físico e, nem presença do parasito ao exame do esfregaço sanguíneo, tornando-se reservatório de infecção para outros cães (MAIA, 2005).

Muitas das manifestações clínicas associadas à babesiose canina são parecidas a outras doenças. Sabe-se também que nas regiões endêmicas é comum a coinfeção de cães por *Babesia* sp., *A. platys*, *E. canis* e/ou *Hepatozoon* sp, considerando que estes agentes compartilham o mesmo vetor, o carrapato *R. sanguineus* (MUNDIM et al., 2008; SANTOS et al., 2009a). Esse fato eleva a possibilidade de agravamento e de quadros clínicos atípicos (KORDICK et al., 1999).

O quadro hematológico típico da babesiose canina é de anemia regenerativa, trombocitopenia moderada a grave e anormalidades leucocitárias variáveis (IRWIN, 2010). A trombocitopenia é um achado extremamente comum. Foi sugerido, após estudo na África do Sul, que a probabilidade de babesiose canina é inferior a 1% na ausência de trombocitopenia (KETTNER et al., 2003). Segundo IRWIN (2010) os valores de proteína plasmática permanecem normais nos animais acometidos.

Num estudo de infecção subclínica por *B. gibsoni*, em cães no Japão, verificou-se que a contagem média de plaquetas era significativamente baixa e, que os níveis de IgG anti-plaquetários foram significativamente mais elevados em cães positivos para *B. gibsoni* pela PCR comparados com cães não infectados (MATSUU et al., 2004). No entanto, o quadro de coagulopatias na babesiose canina não são comuns, encontrada apenas quando ocorre coagulação intravascular disseminada (CID) concomitante ou nos casos de coinfeção com outros patógenos como *Ehrlichia* spp (KORDICK et al., 1999). Outras pesquisas relataram um ligeiro prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada, elevação do nível de produtos de degradação da fibrina e tempo de sangramento da mucosa bucal prolongado na infecção por *B. gibsoni* (JEFFERIES et al., 2007).

A bioquímica sérica em cães com babesiose é geralmente inespecífica, refletindo a relação entre os quadros de hipoxemia e hemólise. Normalmente, há aumentos ligeiros a moderados nas atividades séricas de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e nos valores de bilirrubina (IRWIN, 2010).

A insuficiência renal aguda tem sido descrita como uma complicação de infecções por *Babesia* spp.. Azotemia é comumente visto em infecções por *B. microti*-like, sendo o único fator correlacionado significativamente com a mortalidade. As concentrações séricas elevadas de uréia e creatinina, juntamente com altas concentrações de fósforo inorgânico, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e proteinúria, uma elevada relação proteína/creatinina e a presença de cilindros hialinos e granulosos no exame microscópico do sedimento urinário sugerem alteração na função glomerular (CAMACHO et al., 2004).

### **2.2.7 Diagnóstico laboratorial**

Quando a apresentação clínica é sugestiva de babesiose aguda ou hiperaguda, o exame microscópico do esfregaço sanguíneo, coletado de sangue periférico, continua sendo o teste de diagnóstico mais simples e acessível para a maioria dos veterinários (IRWIN, 2010), baseando se no tamanho e morfologia das formas intraeritrocitárias observadas (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). Na coloração dos esfregaços, geralmente é utilizado o método de Giemsa, mas alterações de coloração podem ser observadas, as quais são atribuídas à mudanças do pH da superfície da lâmina, a falhas na técnica como também à degeneração de leucócitos (STOBBE et al., 1992).

Embora seja caracterizado por ser um método rápido, de baixo custo e elevada especificidade, o exame microscópico proporciona baixa sensibilidade, devido a que, no início da infecção, o nível de parasitemia no hospedeiro não imunocomprometido pode ser inferior a 1% (HUNFELD et al., 2008).

Em presença dessas desvantagens, os testes sorológicos têm sido utilizados para diagnóstico de infecções em cães com infecções crônicas e subclínicas, ou com baixos níveis de parasitemia (BOOZER e MACINTIRE, 2003). Entre os principais estão: a Fixação de Complemento, Aglutinação em Capilar, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (ABOGE et al., 2007).

A RIFI é considerada o método de diagnóstico padrão, por sua alta sensibilidade, mas a especificidade é baixa, podendo acontecer reações cruzadas entre algumas espécies da Ordem Piroplasmida e outros parasitas, como por exemplo, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (YAMANE et al., 1993; DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006a). Esta técnica é muito útil na identificação de infecções crônicas ou em cães infectados com baixos níveis de parasitemia (YAMANE et al., 1993; FUKUMOTO et al., 2001). Entretanto, podem acontecer resultados falso-negativos em infecções hiperagudas, já que os anticorpos só aparecem entre 8 a 10 dias após a infecção (BOOZER e MACINTIRE, 2003).

As técnicas de biologia molecular, como a PCR, têm permitido identificar novas espécies de *Babesia* que acometem os cães, e na detecção de animais portadores, além de realizar pesquisas epidemiológicas sobre a localização e distribuição geográfica destes agentes, identificar novas áreas endêmicas e inclusive identificar espécies em hospedeiros não habituais (ZAHLER et al., 2000; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; JEFFERIES et al., 2003; UILENBERG, 2006)

Dentre os principais testes de biologia molecular que vêm sendo utilizados para pesquisa e diagnóstico da babesiose canina são: A PCR, a Nested PCR, semi-nested PCR, o polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP), sequenciamento e análise filogenética (COSTA-JÚNIOR et al., 2009). A PCR é uma técnica altamente sensível quando comparada com o exame microscópico do esfregaço sanguíneo e mais específica em relação aos testes sorológicos (ANO et al., 2001; BIRKENHEUER et al., 2003). Apesar da PCR ser apropriada para o diagnóstico da babesiose, pela alta sensibilidade esta técnica não permite

distinguir entre infecção aguda e estado de portador (SHAW et al., 2001). Além disso, podem acontecer resultados falso-negativos nas infecções crônicas e, nestes casos é sugerido fazer a PCR em conjunto com técnicas sorológicas, como diagnóstico complementar (IRWIN, 2009). Já nos estados hiperagudos da infecção, a PCR pode identificar *Babesia* spp antes de se observarem os sinais clínicos (FUKUMOTO et al. 2001).

A PCR e RFLP aliadas ao sequenciamento genético, através da caracterização do fragmento 18S do rDNA, permitem diferenciar as três espécies de *B. canis sensu lato* e proporcionar informações taxonômicas, quando características morfológicas de diferentes agente são semelhantes (HOMER et al., 2000), pois cada espécie da Ordem Piroplasmida tem uma virulência e prognóstico diferentes (BIRKENHEUER et al., 2003; LEMOS et al. 2012). Já a seminested PCR permite detectar e diferenciar DNA de *B. canis*, *B. rossi*, *B. vogeli* e *B. gibsoni*, além de prevenir resultados falso-negativos devido às baixas taxas de parasitemia (BIRKENHEUER et al., 2003).

## 2.3 RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA

### 2.3.1 Taxonomia, propriedades, características genéticas e antigênicas dos microorganismos da Ordem Rickettsiales

Em 2001, Dumler et al. sugeriram a divisão da família Rickettsiaceae em dois gêneros, *Orientia* e *Rickettsia* (Figura 7). O gênero *Rickettsia* compreende bactérias da subdivisão alfa da classe Proteobacteria. Este gênero está subdividido em quatro grupos: (1) o grupo tífico (GT), constituída por *R. prowazekii* (tifo epidêmico) e *R. typhi* (tifo murino ou tifo endêmico), (2) o grupo da febre maculosa (GFM), composto por mais de 20 espécies, transmitidas em sua maioria, por carrapatos (DUMLER et al., 2001; CHEN e SEXTON, 2008), 3) o grupo transicional, representado pelas espécies *R. akari*, *R. australis* e *R. felis* e 4) o grupo ancestral (*R. belli* e *R. canadensis*), o quais compartilham características comuns tanto ao GT quanto ao GFM (HORTA et al., 2004; EREMEEVA et al., 2005; LABRUNA, 2006; ESTRADA et al., 2006; MERHEJ e RAOULT, 2011).

As espécies pertencentes ao gênero *Rickettsia* são bactérias Gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórios, tanto das células do hospedeiro vertebrado como das células do vetor invertebrado (LA SCOLA e RAOULT, 1997). Caracterizam-se por ser organismos cocóides, cocobacilares ou pleomórficos, medindo 0,3 a 0,5 µm de diâmetro por



0,8-2µm de comprimento, desprovidas de motilidade e infectam células endoteliais (MURRAY et al., 2009). Dependendo da espécie, são encontradas tanto no citoplasma das células infectadas como também no núcleo (WEISS e MOULDER, 1984).

As rickettsias possuem uma microcápsula de espessura variável. Esta microcápsula é de aparência semelhante em outras espécies de bactérias e pode desempenhar um papel na patogênese do organismo (HAYES et al., 1982). Os membros da família de Rickettsiaceae não se coram, adequadamente, com a técnica de Gram e são melhor visualizadas quando coradas pelo método de Giménez (GIMÉNEZ, 1964). Métodos de coloração com imunoperoxidase, também podem ser usados para visualizar *R. rickettsii* em tecidos fixados (PROCOP et al., 1997)

Domínio: Bactéria

Filo: Proteobacteria

Classe: Alphaproteobacteria

Ordem: Rickettsiales

Família: Anaplasmataceae

Holosporaceae

Rickettsiaceae

Gênero: *Rickettsia*

*Orientia*

**Figura 7.-** Representação da classificação sistemática de rickettsias. Adaptado de Berg's Manual of Systematic Bacteriology, 2004 (GARRITY et al., 2004).

As rickettsias, assim como outras bactérias gram negativas, caracterizam-se por possuir parede celular composta por lipopolissacarídeos e peptidoglicano. O genoma das riquétsias é constituído por um único cromossomo pequeno, circular e altamente conservado. Devido ao fato de que estes agentes conseguem extrair substratos essenciais do citoplasma da célula eucariótica hospedeira, os genes que codificam as enzimas para o metabolismo de açúcar, síntese de lipídios e aminoácidos, foram perdidos ao longo da evolução (WALKER, 2007; CHEN e SEXTON, 2008). Algumas riquétsias patogênicas compartilham proteínas de membranas externas com riquétsias não patogênicas. O potencial patogênico está relacionado às alterações destas proteínas de superfície causado por mutações gênicas e, não simplesmente aos aspectos morfológicos ou bioquímicos das rickettsias (BURGDORFER, 1970; WELLER

et al., 1998). Entre estas proteínas, destacam-se a presença da proteína de superfície de membrana B de 135 kDa (rOmpB), uma lipoproteína de 17 kDa e a proteína de superfície de membrana A de 190 kDa (rOmpA) (ELISBERG e BOZEMAN, 1979; WEISS e MOULDER, 1984; OLSON e MCDADE, 1994; WALKER e BOUYER 2003; WALKER, 2007; FOURNIER e RAOULT, 2009).

A análise filogenética realizada com sequências dos produtos amplificados com iniciadores do gene *16S RNA*, permite confirmar a unidade evolutiva do gênero, mas dificulta as inferências de filogenia dentro do mesmo. Estudos feitos com iniciadores que amplificam parte deste gene, permitem identificar espécies do grupo da febre maculosa (GFM) e o grupo tífico (TG). Além disso, permite a separação das espécies *R. canadensis* e *R. bellii* em um clado diferente, agrupando estas no denominado Grupo Ancestral (STOTHAR e FUERST, 1995; OGRZEWALSKA et al., 2012). Devido às limitações do gene *16S RNA* para diferenciar as espécies dentro do gênero, começou-se usar outros genes incluindo o gene *gltA*, o gene da proteína 17 kD, *ompA*, *ompB*, *sca4*, *sca1* e *sca2* (FOURNIER e RAOULT., 2009).

Sabe-se que a proteína de membrana rOmpA é específica para rickettsias do GFM. É por isso, que o gene *ompA* não pode ser utilizado para reconhecer espécies do Grupo Tífico e outras como *R. helvetica*, *R. akari*, *R. canadensis* e *R. bellii*. Já o gene *ompB* permite reconhecer espécies do grupo GT e do GFM, excetuando *R. bellii* e *R. canadensis*, e o gene que codifica a proteína 17 kD não é muito utilizado para estudos de análise filogenética, devido aos baixos valores “bootstrap” (FOURNIER e RAOULT., 2009)

### 2.3.2 Epidemiologia

A febre maculosa (FM), riquetsiose mais importante no mundo, é ocasionada principalmente pelas espécies *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. akari*, e *R. massiliae* (CDC, 2006; BRASIL, 2009; SUCEN, 2009). O GFM está composto, até o momento, por 60 espécies, mas apenas 12 destas são consideradas patogênicas para seres humanos (quadro 8). Várias outras espécies do GFM têm sido relatadas em carrapatos nas Américas, porém sem qualquer vínculo com casos de febre maculosa em humanos (DÍAZ, 2001; LABRUNA, 2009).

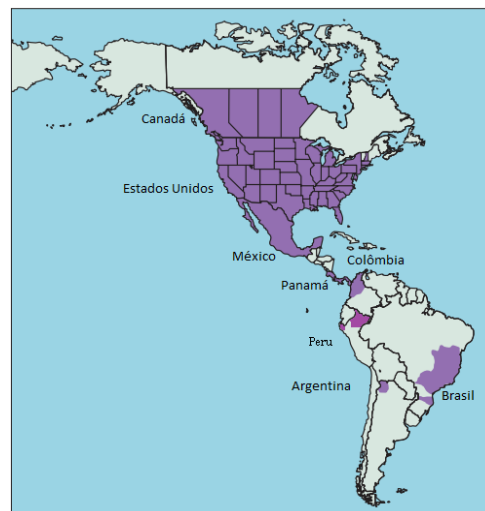
Nas Américas, a febre maculosa tem sido identificada nos Estados Unidos, Canadá, México, Panamá, Costa Rica (RODANICHE e RODANICHE, 1950; BUSTAMANTE e

VARELA, 1947; FUENTES, 1979; LABRUNA et al., 2011), na província de Jujuy na Argentina (PADDOCK et al., 2008), Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, e Santa Catarina) (GUEDES et al., 2005), Colômbia (HIDALGO et al., 2007) e Peru (FORSHEY et al., 2010) (Figura 8).

**Quadro 8.** Riquetsioses patogênicas do GFM no Mundo.

Espécie	Doença
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Febre maculosa das Montanhas Rochosas
<i>R. conorii</i>	Febre botonosa
<i>R. africae</i>	Febre da picada do carrapato
<i>R. australis</i>	Febre do carrapato de Queensland
<i>R. honei</i>	Tifo da ilha Flinders
<i>R. sibirica</i>	Tifo siberiano ou do norte da Ásia
<i>R. japonica</i>	Febre maculosa oriental
<i>R. mongolotimonae</i>	Rickettsiose européia
<i>R. slovaca</i>	Rickettsiose européia
<i>R. helvética</i>	Rickettsiose européia
<i>R. akari</i>	Rickettsiose variceliforme ou vesicular

Adaptado: (BEATI e RAOULT 1998; SANGIONI, 2003; LAMAS et al., 2008; LABRUNA, 2009; FOURNIER e RAOULT 2009; LABRUNA et al., 2011).



**Figura 8.-** Distribuição geográfica aproximada da Febre Maculosa no continente americano. As áreas sombreadas mostram as regiões onde a Febre Maculosa é endêmica. (Adaptado de: DANTAS-TORRES, 2007)

A incidência anual média estimada de Febre Maculosa, durante o período de 1997 e 2002, foi de 2,2 casos por milhão de pessoas nos Estados Unidos (EUA), mas a incidência

varia substancialmente cada ano. Por exemplo, apenas 395 casos de FM foram relatados nos "Centers for Disease Control" (CDC) em 1997, no entanto, mais de quatro vezes o número de casos (1843 casos) foram relatados em 2005 (CHAPMAN et al., 2006). Essas variações poderiam ser causadas por fatores climáticos, fatores administrativos (relacionados ao preenchimento complicado dos relatórios de notificação), ou por variações reais na incidência (CHEN e SEXTON, 2008). Nos EUA, a Febre Maculosa ocorre em todos os 48 estados, com exceção de Vermont e Maine; sendo que a metade dos casos são encontrados em Oklahoma, Tennessee, Arkansas e na região do Atlântico Sul, principalmente em Maryland, Virginia, e no Norte de Carolina do Sul.

Já no Brasil, a Febre Maculosa Brasileira (FMB) foi descrita em até 11 estados brasileiros, tendo sido descrita pela primeira vez na região sudeste em 1929 por José Toledo Piza (Apud MOLITERNO et al., 2009). Desde então, a predominância dos casos é maior na região sudeste do país, sendo os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro com maior incidência de casos. O Ministério de Saúde do Brasil, no período de 2007 a 2013, ratificou 807 casos de febre maculosa (BRASIL, 2014). Devido à sua relevância, desde 2001 a FMB foi introduzida na categoria de doença de notificação compulsória, regulamentada pela portaria nº 2325/GM de dezembro de 2001 (BRASIL, 2001).

Paddock et al., (2008) reportaram pela primeira vez evidência molecular de *R. rickettsii*, isolado do vetor *Amblyomma sculptum* (complexo *A. cajennense*), na província de Jujui na Argentina. Entretanto, como o tifo epidêmico foi relatado em diferentes regiões da Argentina, entre os anos de 1920 e 1930, é provável que alguns relatos iniciais de "tifo" na Argentina, representem casos de febre maculosa, pois casos de Febre Maculosa foram identificados erroneamente como epidemia ou tifo murino nos Estados Unidos e em outras regiões da América do Sul durante o início século vinte.

No Chile, Lopez e Azócar (2007), relataram 35% (27/77) de anticorpos anti-*R. conorii* (RIFI) em soros de cães de zonas urbanas, dois deles com sinais clínicos como apatia, paresia das extremidades posteriores, melena, linfadenopatia, dor lombar, petéquias nas mucosas e conjuntivites. Os autores reportaram, ainda, que 23,4% (18/77) de soros eram positivos para *A. phagocytophilum* (RIFI), sendo relatado que em seis animais havia coinfeção. Já na Colômbia, especificamente em Cundinamarca, foi relatada a detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii* (RIFI) em cães e equinos, encontrando-se uma soropositividade de 18,2% (4/22) e

16,3% (26/159) respectivamente (HIDALGO et al., 2009). Apesar ter sido realizada a identificação do agente mediante técnicas moleculares, neste estudo, foi possível, aos autores, propor que estas duas espécies podem servir como hospedeiros sentinelas da rickettsiose.

No Peru, Blair et al. (2004) documentaram, mediante detecção molecular, a presença de agentes do GFM em três localidades no noroeste do país (departamento de Piura) durante um surto de febre no período de junho e novembro de 2002. Neste estudo, os autores coletaram um total de 16 carrapatos (*Amblyomma tigrinum*, *A. maculatum*, *Anocenter nitens*, *Boophilus* sp., *Ixodes boliviensis* e *Ixodes pararicinus*) e 59 pools de pulgas (*Adoratopsilla intermedia*, *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans*, *Neotyphloceras crassispina* e *Xenopsylla cheopis*), tanto de animais domésticos como animais de vida livre, sendo positivas para GFM, *Amblyomma maculatum* (2), *Anocenter nitens* (1), *Ixodes boliviensis* (1), *Ctenocephalides felis* (2). As sequências obtidas dos produtos amplificados dos genes parciais *ompA* e *htrA* nas duas amostras de pulga, demonstraram 100% de homologia para *R. felis* mediante análise filogenética. Já as sequências obtidas dos produtos utilizando o gene *ompB* em duas das 4 amostras positivas nos carrapatos (*I. boliviensis* e *A. maculatum*), demonstraram uma homologia de 97% para *R. aeschlimannii* e *R. rhipicephali*. Além disso, em 100 % das amostras positivas dos carrapatos, utilizando o gene parcial *htrA*, foi descrita uma homologia de 98-99% com membros do GFM mediante análise filogenética.

Já no Departamento de Loreto, cidade de Iquitos, situado na região amazônica peruana, foi realizado um estudo de soroprevalência para anticorpos IgG contra agentes do GFM e do GT, tanto em humanos como em animais domésticos. Dos 1195 soros de humanos analisados (ELISA), 521/1195 (43,6%) e 123/1195 (10,3%) foram positivos para anticorpos GFM e GT, respectivamente. Além disso, dos 71 cães testados, 42/71 (59,2%) foram positivos para anticorpos GFM e 2/71 (2,8%) foram positivos para anticorpos GT. Além das amostras de soro, foram coletados ectoparasitos dos cães: 170 pulgas (*Ctenocephalides felis*), 43 piolhos (*Menacanthus* spp.) e dois carrapatos (*R. sanguineus*), dos quais, 71/74 (95,9%) pools (2 pulgas por pool) de *C. felis*, testados para amplificar sequências específicas dos genes *gltA* e *OmpA* pela PCR, foram positivos para GFM e tanto piolhos como os carrapatos foram negativos pela PCR. Não obstante, não houve correlação entre as pulgas positivas para GFM e os cães soropositivos para GFM ( $p > 0,05$ ). Já mediante análise filogenética, as sequências dos produtos obtidos utilizando os genes parciais *htrA* e *gltA*, demonstraram identidade maior de 94% e menor de 92% para GFM e GT respectivamente (FORSHEY et al., 2010).

### 2.3.3 Rickettsias do grupo da Febre Maculosa em carrapatos

O alcance geográfico da FM são inteiramente determinados pela distribuição e atividade dos vetores (carrapatos). São três, as espécies de carrapatos conhecidas, nos Estados Unidos, que transmitem a FM: o *Dermacentor variabilis*, *D. Andersoni* e *Rhipicephalus sanguineus* (NICHOLSON et al, 2006). Já no Brasil, *A. sculptum* (complexo *A. cajennense*) (NAVA et al., 2014) compreende um táxon amplamente distribuído e implicado como maior responsável pela FMB, seguido de *A. aureolatum* (LABRUNA, 2009; OGRZEWALSKA et al., 2012).

O carrapato *A. sculptum* (complexo *A. cajennense*), é considerado o principal responsável pelos casos de FM, na maioria das regiões com maior ocorrência. Está presente apenas no continente sul-americano, encontrando-se preferencialmente nas regiões com temperaturas médias de 18 a 26°C. Este ixodídeo exige três hospedeiros para completar o ciclo, a baixa especificidade para hospedeiros, especialmente nos estágios de larva e ninfa, faz que parasite uma grande variedade de hospedeiros desde pequenos e grandes mamíferos até aves e répteis (ARAGÃO, 1936; ESTRADA-PEÑA et al., 2004).

No Brasil o carrapato *A. cajennense* foi considerado como principal vetor implicado na epidemiologia da FMB. Contudo, estudos apontaram a espécie como um complexo de diferentes espécies, com sítios geograficamente distintos (LABRUNA et al., 2011; NAVA et al., 2014; NUNES et al., 2015). Este complexo envolve seis espécies: *A. cajennense*, onde *A. interandinum*, *A. patinoi* e *A. tonelliae*, representam três novas espécies enquanto *A. mixtum* e *A. sculptum* representam espécies ressurgentes (NAVA et al. 2014), deste modo, os casos de FMB transmitidos pelo que até então se conhecia como *A. cajennense* possivelmente foram transmitidos por vetores diferentes de acordo com a população e região estudada. A partir do estudo de Nava et al. (2014), a espécie que se refere ao Complexo *Amblyomma cajennense* na região do sudeste brasileiro passou a ser identificada como *A. sculptum*.

O carrapato *R. sanguineus*, tem sido incriminado como vetor de *R. rickettsii* no México (EREMEEVA et al., 2011) e no estado de Arizona (EUA) (DEMMA et al., 2005). Na região sudeste do Brasil, é considerado como vetor potencial após recentes reportes de infecção experimental e detecção de infecção natural (PIRANDA et al., 2005; PACHECO et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012). Este carrapato, de hábito intradomiciliar, que parasita principalmente cães domésticos (DANTAS-TORRES, 2008) e que pode parasitar

humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006), poderia ter um papel relevante como vetor em algumas zonas endêmicas com características ecológicas específicas.

Importante destacar que nos carrapatos, quando infectados pelas rickettsias, pode acontecer transmissão transestadial e transovariana. Esta característica biológica permite ao vetor estar infectado durante toda a sua vida, e também repassar a bactéria *R. rickettsii* entre os estágios evolutivos e transmitida para os hospedeiros vertebrados durante repasto, ficando infectados por toda vida. Assim, além de vetores transmissores, também são importantes reservatórios da FM. A curta duração da circulação de *R. rickettsii*, no sangue de pequenos mamíferos hospedeiros, destaca o papel dos carrapatos como reservatórios, sendo a relação dos carrapatos com as bactérias extremamente relevante (GUEDES et al., 2005; PAROLA et al., 2005).

Soares et al. (2012), avaliaram e quantificaram a transmissão transovariana e transestadial de *R. rickettsii*, assim como as taxas de mortalidade dos diferentes estágios evolutivos em uma colônia de *A. sculptum* (complexo *A. cajennense*). Eles verificaram que tanto ninfas como adultos têm um maior potencial de transmissão de *R. rickettsii* do que as larvas, devido a uma maior mortalidade dessas últimas. Além disso, há evidências de que *R. rickettsii* é patogênica para o vetor, já que carrapatos como *A. sculptum* infectados por este agente tem menor capacidade reprodutiva (SOARES et al., 2012) e carrapatos como *D. andersoni* e *D. variabilis* apresentam uma baixa taxa de sobrevivência (BURGDORFER e BRINTON, 1975; NIEBYLSKI et al., 1999).

Estes achados explicariam porque é difícil encontrar, por exemplo, um exemplar de *R. sanguineus*, *D. andersoni* ou *A. sculptum* naturalmente infectado por *R. rickettsii* na natureza e são confirmados pelas baixas frequências de carrapatos naturalmente infectados, < 2%, mesmo em regiões consideradas como endêmicas para FM (GUEDES et al., 2005; SANGIONI et al., 2005; PACHECO et al., 2009). Deve-se considerar, ainda, a presença de hospedeiros vertebrados com um grau de bacteremia aceitável para infectar novos carrapatos suscetíveis (LABRUNA, 2009).

Os elementos que contribuem para melhor competência vetorial na relação *Rickettsia*-carrapato são: (1) requerimento de uma dose mínima da bactéria para iniciar a infecção no artrópode; (2) infecção generalizada do vetor; (3) tropismo pelos tecidos como glândula

salival e intestinos (reservatório); (4) fenômeno de reativação; (5) as formas de inoculação (via salival e via estercoraria) e (5) a capacidade da transmissão transovariana (TELFORD, 2005).

Niebylsky et al. (1999), relataram que existe uma associação biológica *Rickettsia*-carrapato. Eles relatam um fenômeno de “reativação” da bactéria associada a condições específicas do artrópode com o meio ambiente. Em condições de estresse fisiológico, submetendo ao carrapato a baixas temperaturas (4°C) e jejum, a bactéria inicia um estado de latência, o qual finaliza quando o carrapato inicia o consumo de sangue no hospedeiro susceptível e a temperatura interna no carrapato incrementa após de um tempo definido (24-48 horas).

#### **2.3.4 Imunopatogenia**

Devido a variação patogênica entre as diferentes cepas de *R. rickettsii*, diversas pesquisas têm sido incapazes de correlacionar a virulência de *R. rickettsii* nos modelos animais com as características clínicas de cepas obtidas em seres humanos infectados. Cepas isoladas em humanos que manifestavam um quadro clínico grave, muitas vezes não provocaram o mesmo quadro clínico, ou ocasionam um quadro clínico leve nos animais de laboratório. A virulência das diferentes cepas de *R. rickettsia* parecem estar afetada por fatores como: (1) origem geográfica da cepa, (2) estado de alimentação do carrapato, (3) dose inoculada e (4) determinados fatores do hospedeiro, tais como deficiência de desidrogenase glicose-6-fosfato, idade e raça (CHEN e SEXTON, 2008).

A transmissão da FM acontece por meio da salivação do carrapato infectado no período do repasto sanguíneo, quando o vetor regurgita o conteúdo junto com a *Rickettsia* (CAMARGO-NEVES et al., 2004). Em seguida, o microorganismo é levado pelo sistema linfático ou pelos pequenos vasos sanguíneos para a circulação, onde pela adesão inicial aos receptores do colesterol localizados na membrana das células endoteliais dos pequenos vasos do hospedeiro, induzem sua própria fagocitose (WALKER, 2007).

Uma vez dentro do citoplasma e pela ação das fosfolipases (fosfolipases D e tlyC), a membrana vascular é lesada e estes ficam livres no citosol, iniciando a fase de replicação por fissão binária simples (WALKER et al., 2003). Iniciada a fase intracelular, as rickettsias



utilizam outra proteína, chamada de RickA. Este antígeno ativa a Arp2/3 promovendo a polimerização da actina celular, a qual age como propulsor da bactéria pelo citoplasma da célula hospedeira facilitando a rápida disseminação intercelular dentre as células endoteliais (CHEN e SEXTON, 2008)

Este processo produz um aumento na permeabilidade vascular ocasionada pela quebra das junções “gap” entre as células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos infectados. Apesar da *R. rickettsii* não secretar exotoxinas, esta usa a fosfolipase A, proteases e radicais livres induzindo lesão na membrana celular das células endoteliais resultando na necrose celular (WALKER, 2007; CHEN e SEXTON, 2008).

Como consequência da ativação endotelial pelas citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , ao parecer produzidas pelas células NK e linfócitos, após a entrada das rickettsias nas células endoteliais, estas últimas adquirem a capacidade de matar as rickettsias através da síntese do óxido nítrico por meio do mecanismo óxido nítrico sintetase. Diversos estudos realizados em animais de laboratório indicaram que as células endoteliais desempenham um papel importante na apresentação de antígenos e na ativação de células T CD8 + (VALBUENA e WALKER, 2009). Não obstante, este mecanismo de citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8+ induz a apoptose das células infectadas por *R. rickettsii*, incrementando a permeabilidade vascular, edema, e ativação de mecanismos de coagulação e resposta inflamatória humoral. Essa lesão disseminada sofrida nas células endoteliais resulta em disfunção orgânica generalizada e provavelmente no rompimento da homeostase (WALKER et al., 2003).

### **2.3.5 Achados clínicos e laboratoriais nas rickettsioses em cães**

A infecção nos vertebrados, na maioria das vezes, acontece quando carrapatos infectados alimentam-se em hospedeiros susceptíveis. Uma infestação pode originar alterações laboratoriais como anemia, pelos períodos prolongados de alimentação hematófaga, além de sinais clínicos com anorexia e prostração. Além disso, pela ação imunossupressora das toxinas presentes na saliva do vetor, a picada do carrapato predispõe ao hospedeiro a desenvolver outras doenças. (LABRUNA et al., 2004).

Apesar da maioria dos casos de infecções em cães serem subclínicas, e de serem observadas elevadas taxas de soropositividade em animais sadios em zonas endêmicas, Piranda et al. (2008), mediante infecção experimental em cães com *R. rickettsii*, reportaram

sinais clínicos como: lesões oculares caracterizadas por secreção ocular bilateral, congestão escleral e edema conjuntival, anorexia, febre (temperatura retal  $> 39,5^{\circ}\text{C}$ ) e letargia. Os cães desse estudo apresentaram rickettsemia (determinada pela PCR em tempo real e inoculação de cobaias com sangue canino) de 3 a 13 dias após a infecção (média = 8,3 dias). Em relação às alterações hematológicas, a concentração de hemoglobina e a contagem de plaquetas diminuíram abaixo do intervalo de referência para cães durante o período febril. Não foram observadas alterações na contagem de eritrócitos ou de leucócitos. Nenhum cão apresentou sinais hemorrágicos (incluindo cutâneos ou mucosos), locomotores ou neurológicos durante o estudo. Piranda et al. (2011), avaliando se os cães infectados experimentalmente com *R. rickettsii* poderiam servir como hospedeiros amplificadores, observaram que os cães foram capazes de transmitir *R. rickettsii* para *R. sanguineus*, variando de acordo com o estágio do carrapato e a via de inoculação, observando-se um maior grau de transmissão pela via intraperitoneal.

Angerami et al. (2006), em um estudo retrospectivo realizado no Hospital de Clínicas da UNICAMP em São Paulo, descreveram os principais aspectos clínicos e laboratoriais reportados em pacientes humanos diagnosticados com FMB, entre os períodos de 1985 a 2003. Febre foi o sinal clínico relatado em todos os pacientes. Entre os sintomas gerais incluem mialgia, dor de cabeça, vômito e dor abdominal ocorrendo em 80%, 66%, 42% e 38%, respectivamente. Além disso, exantema com padrão maculopapular foi observado em 52% dos pacientes. Em relação aos casos com maior letalidade, icterícia foi observada em 52% dos pacientes, comprometimento do sistema nervoso central em 43%, dificuldade respiratória em 37% e insuficiência renal aguda em 35,3%. Diferentes graus de manifestações hemorrágicas, desde petéquias disseminadas até difusões cutâneas hemorrágicas, foram observadas em 69,5% dos pacientes.

As alterações hematológicas e bioquímicas incluem hipoalbuminemia, trombocitopenia e aumento das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. A recuperação clínica do hospedeiro está relacionada com a precocidade do diagnóstico e tratamento, e de uma eficaz resposta imune do paciente (WALKER, 2002).

### 2.3.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da doença rickettsial, geralmente é baseado a partir de testes sorológicos, principalmente pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Entretanto, existem diversos métodos de diagnóstico sorológico para rickettsias: teste Weil-Felix, reação de fixação de complemento, testes de aglutinação, ELISA e imunoblot (LA SCOLA e RAOULT, 1997; PAROLA et al., 2013).

A soroconversão, para qualquer doença rickettsial, é detectada 7 a 15 dias após o início da doença. Para se definir uma infecção recente, precisa-se observar um aumento nos títulos de amostras pareadas obtidas num prazo de 2 a 4 semanas (PAROLA et al., 2013). Devido à soroconversão tardia, o diagnóstico é feito de forma geral após a fase convalescente ou óbito do paciente (DASH e EREMEEVA, 2006).

A RIFI é considerada o teste padrão-ouro para diagnóstico, sendo a técnica de alta sensibilidade e especificidade, e de referência para detecção de casos agudos. Apesar de ser uma prova fácil e rápida que proporciona bons resultados, tem as desvantagens que demanda equipamentos especiais, é um teste subjetivo, sujeito a erros de leitura por parte do pesquisador, podendo ocasionar discrepâncias nos resultados (DASH e EREMEEVA, 2006).

Não obstante, o diagnóstico sorológico não permite identificar a espécie de rickettsia, devido à reação cruzada entre as espécies do gênero *Rickettsia*. É por isso, que a caracterização do agente é realizada mediante o uso de métodos moleculares (PAROLA et al., 2013).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento têm assumido grande importância na identificação, detecção e esclarecimentos com relação a espécies do gênero *Rickettsia* já relatadas (GALVÃO et al., 2006). Atualmente, são consideradas ferramentas rápidas, sensíveis e altamente específicas para detecção de espécies do gênero *Rickettsia* em amostras de sangue humano e animal como: biópsia de pele, artrópodes, biopsias cutâneas, sangue, líquido cefalorraquidiano e exsudados (GÜNTHER e HAGLUND, 2005).

Os principais marcadores utilizados na detecção de espécies do gênero *Rickettsia* está o fragmento que codifica o gene citrato sintase (*gltA*). Regnery et al. (1991) reportaram, neste

gene, uma sequência específica comum a todas as espécies do gênero *Rickettsia*. Por outro lado, outros autores sugeriram o uso marcadores que amplificam uma sequência parcial do gene 17KDa, comum tanto para aos GFM e GT, podendo ser utilizado em conjunto com marcadores internos (*nested primers*) da mesma sequência, aumentando assim, a sensibilidade do teste (AZAD et al., 1990; SCHRIEFER et al., 1994). Em relação a detecção das espécies do GFM, foi relatado o uso de marcadores que amplificam sequências parciais genômicas dos genes responsáveis por codificar proteínas de membrana externa (rOmpA e rOmpB), chamados *OmpA* e *OmpB* (REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994). A detecção e identificação molecular das rickettsias através da PCR, em conjunto com o sequenciamento são, atualmente, os método padrão para identificação e análise filogenética das diferentes espécies do gênero *Rickettsia* (REGNERY et al., 1991).

### 3. OBJETIVOS

Desta forma, o presente estudo teve como objetivos:

#### Objetivo Geral

Obter informações epidemiológicas sobre as infecções e presença dos agentes de membros Ordem Rickettsiales e agentes da Ordem Piroplasmida, que acometem cães (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) e seus carrapatos (Acari-, Ixodidae) da região Metropolitana da Província de Piura, no Departamento de Piura-Peru, por meio de técnicas moleculares, determinar as espécies envolvidas nas infecções, assim como conhecer a fauna de Ixodídeos nessa região.

#### Objetivos Específicos

- I. Determinar a presença e frequência de infecções por membros da família Anaplasmataceae em cães e seus carrapatos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- II. Identificar as espécies, e determinar a frequência destas pela PCR e Nested-PCR, associadas ao sequenciamento, nas amostras positivas para família Anaplasmataceae.
- III. Determinar a presença e frequência de Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa pela PCR, associada ao sequenciamento, em carrapatos de caninos domésticos.
- IV. Avaliar a frequência de *Babesia* spp., e caracterizar geneticamente as espécies de *Babesia* spp.
- V. Avaliar a associação de infecção em relação às variáveis inerentes ao animal (idade, sexo, presença de carrapatos e convivência com outros animais) como variáveis não inerentes ao animal (fatores socioeconômicos).
- VI. Identificar a fauna de Ixodídeos presente nos animais estudados.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 COMITÊ DE ÉTICA**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (CEPA) - PROPP – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO sob o protocolo 759 (Anexo 1).

### **4.2 DELINEAMENTO DE ESTUDO**

#### **4.2.1 Escolha da Espécie e lugar**

A escolha dos cães foi baseada na importância da espécie como principal hospedeiro dos diferentes agentes membros da Família Anaplasmataceae e agentes da Ordem Piroplasmida e pela possibilidade de compartilhamento de ixodídeos entre os cães e seus proprietários. Foram analisadas amostras de cães de zonas urbanas, com evidência sorológica para os agentes de interesse do presente estudo, na região metropolitana da província de Piura, Peru.

#### **4.2.2 Tamanho da amostra**

Para determinar o número das amostras utilizou-se a fórmula para estimar uma proporção (DANIEL, 1996).

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{E^2}$$

n: tamanho da amostra

Z: 95% = 1.96 (nível de confiança)

p: 0,165 (ADRIANZÉN et al., 2003)

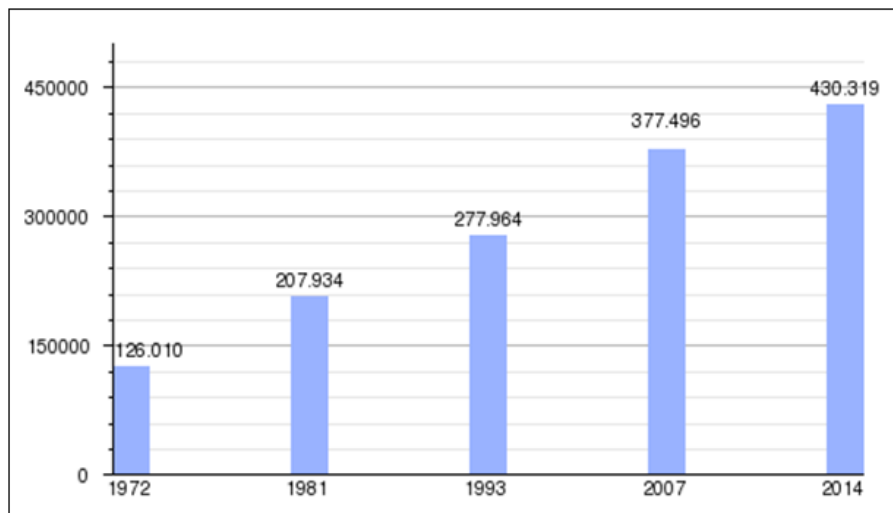
E: 0,05 (precisão)

$$n=212$$

A coleta de carrapatos e do sangue foi efetuada no período de dezembro 2014 a março de 2015, época de predomínio do estágio adulto de ixodídeos na região, segundo Glenny et al. (2004).

#### 4.2.3 Descrição geográfica da área de estudo

O território Peruano é constituído por 24 Departamentos. O Departamento de Piura está situado na costa norte do oceano Pacífico sendo formado por oito Províncias: Ayabaca, Huancabamba, Morropón, Paita, Piura, Sechura, Sullana e Talara. A Província de Piura é constituída por dez Distritos (Catacaos, Cura Mori, El Tallán, La arena, La unión, Las Lomas, Tambogrande, 26 de Octubre, Piura e Castilla). A região Metropolitana de Piura está localizada na zona central do Departamento de Piura. Esta área está formada pelos municípios distritais de Piura, Castilla, Catacaos, Cura Mori, La Arena e La Unión (Figura 10) A população humana está em crescimento e atualmente conta com 450.363 habitantes (Figura 9), representando 1,64% da população Peruana (Densidade demográfica: 126,56 Hab./Km<sup>2</sup>). Sua altitude é 29 metros no nível do mar, latitude 4° 59` 24. 00``S e longitude 80° 24` 36. 00``W-GR. A região metropolitana de Piura está representada com uma extensão territorial de 3558,33 km<sup>2</sup>, o equivalente a 9%, aproximadamente, da área total da Província. A economia está voltada à indústria do petróleo, mineira e à produção agropecuária (INEI, 2007; SENAMHI, 2011).



**Figura 9.-** Crescimento populacional no Departamento de Piura - Peru.  
Fontes: Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI)

A Cordilheira Andina forma uma barreira física intransponível aos ventos alísios que se originam do Oceano Atlântico. Com aproximadamente 6.000 metros de altitude, a cordilheira impede que a umidade atmosférica e as nuvens carregadas de chuva que alimentam a região Amazônica do Brasil e o oriente Peruano, cheguem a Piura. Adicionalmente, é importante mencionar que o território costeiro se distingue por características áridas, não obstante, a corrente marinha fria de Humboldt faz com que o clima na zona central da costa de Piura se caracterize por temperaturas médias anuais máximas e mínimas de 31,2 e 17,7°C respectivamente (Quadro 9). A umidade relativa média do ar é 83% pela manhã e 51% pela noite (INEI, 2007; SENAMHI, 2011).

O grupo de pesquisa organizou uma campanha de controle de pulgas e carrapatos em cães da região metropolitana da província de Piura-Peru, fornecendo tanto informações sobre as principais doenças transmitidas pelos carrapatos como tratamento preventivo ou de controle contra ectoparasitos (pulgas e carrapatos). Os responsáveis interessados eram agendados via “e-mail”, e tanto o tratamento como a coleta das amostras, foram realizados na casa destes, configurando, assim um estudo transversal com amostra de conveniência.

**Quadro 9.** Médias máximas e mínimas dos Parâmetros Climáticos (Temperatura e precipitação) no Departamento de Piura, 2015.

Mês	Jan	Fev	Mar	Abril	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Média
<b>Temperatura máxima absoluta (°C)</b>	38,9	38,3	39,4	38,3	37,2	34,4	36,1	32,8	27,2	33,9	33,9	36,7	39,4
<b>Temperatura máxima média (°C)</b>	33,4	34,3	34,5	33,4	31,2	28,9	28,1	28,6	29,3	29,8	30,4	32	31,2
<b>Temperatura máxima absoluta (°C)</b>	20,1	21,1	21	19,6	17,1	16,4	15,5	15,4	15,5	15,8	16,6	18	17,7
<b>Temperatura mínima absoluta (°C)</b>	14,4	17,8	18,3	16,1	13,3	13,3	11,1	11,7	13,3	12,8	11,7	11,7	11,1
<b>Precipitação total (mm)</b>	5,4	8,3	18,1	4,1	0,1	0	0,7	0	0	1,7	1,1	0,6	40,1

**Fonte:** Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI).



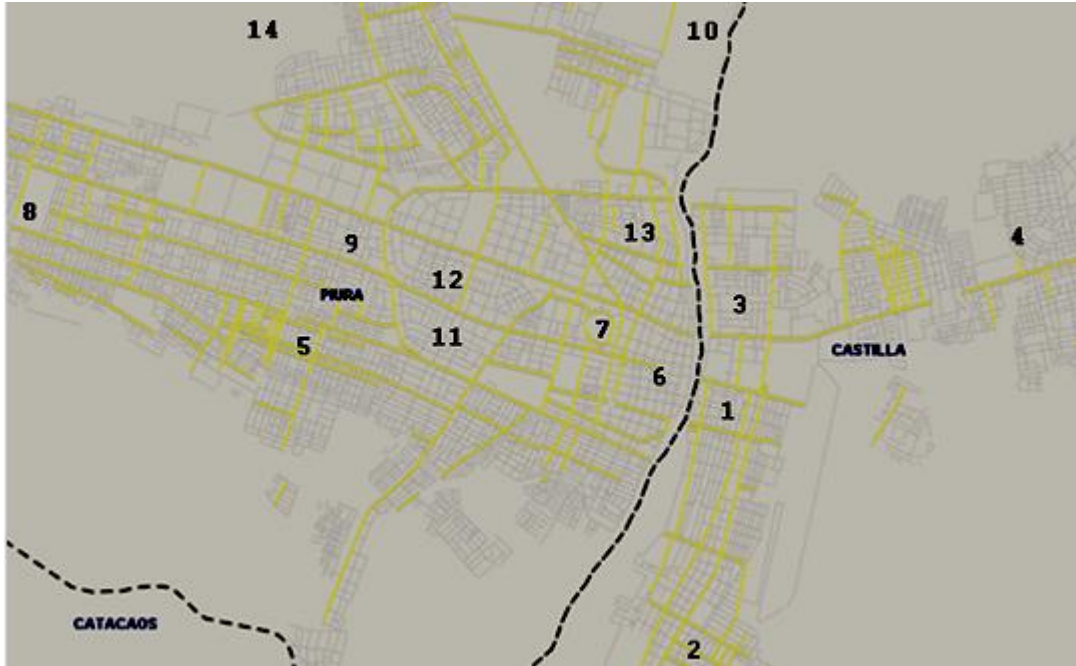


**Figura 10.** (A) Localização geográfica do Departamento de Piura no mapa político do Peru. (B) Localização geográfica dos distritos (letras verdes) e das oito províncias (letras vermelhas) do Departamento de Piura. Fonte: Instituto Geográfico Nacional (IGN).

As amostras foram coletadas em diferentes bairros de dois dos principais distritos da província de Piura, Castilla e Piura, que estão separados pelo rio Piura. Por um lado ficam os bairros de Ayacucho (1), Campo Polo (2), Miraflores (3), Tacalá (4) no distrito de Castilla. Do outro lado, no Distrito de Piura, os bairros de Ricardo Jauguari (5), Piura Centro (6), Los cocos (7), Enace (8), Las Mercedes (9), Rio Sol (10), San José (11), Santa Ana (12), Santa Isabel (13) e Santa Margarita (14) (Figura 11).

#### 4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

De todos os animais da Região Metropolitana da Província de Piura-Peru foram registradas as informações individuais fornecidas pelos proprietários que incluíam gênero, faixa etária, presença de carrapatos e convivência com outros animais (Anexo 3). Os animais do presente estudo foram categorizados segundo HAND et al. (2000) em jovens (< 1 ano), adultos (1 a 7 anos) e de idade avançada (> 7 anos).



**Figura 11.** Localização dos diferentes bairros nos Distritos de Piura e Castilla onde foram coletadas as amostras. Fonte: Sistema de Información Geográfica para Emprendedores (SIGE)

Após os responsáveis pelos animais concordarem com os procedimentos propostos e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), obteve-se uma amostra sanguínea de 212 animais, independente do estado clínico do animal e foram coletados os espécimes de carrapatos. As informações necessárias para a pesquisa, como os níveis socioeconômicos dos principais bairros dos Distritos de Piura e Castilla (Quadro 10), foram registradas em fichas próprias (anexo 3).

#### 4.3.1 Coleta do Sangue

Para a detecção molecular dos agentes de membros da Família Anaplasmataceae, Rickettsias do grupo da Febre Maculosa (RGFM) e agentes da Ordem Piroplasmida, coletaram-se 216 amostras de sangue total (2mL aproximadamente), de cães domésticos provenientes da região Metropolitana da Província de Piura-Peru, por punção das veias jugular ou cefálica, mediante uso de seringas e agulhas descartáveis estéreis. As amostras foram acondicionadas em tubos com EDTA, identificados, e foram mantidos em caixas térmicas com gelo reciclável até a chegada ao laboratório. As amostras foram separadas em alíquotas de 1mL e mantidas a - 20°C até a extração de DNA, a qual foi realizada no

laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Peru.

**Quadro 10.** Nível Sócio Econômico dos principais bairros dos Distritos de Piura e Castilla, da Província de Piura, Piura-Peru.

Distrito	Bairro	Níveis Socioeconômicos				
		Alto	Médio alto	Médio	Médio baixo	Baixo
Castilla	Ayacucho					
	Campo Polo					
	Miraflores					
	Tacalá					
Piura	Ricardo Jaugueri					
	Piura Centro					
	Los cocos					
	Enace					
	Las Mercedes					
	Rio Sol					
	San José					
	Santa Ana					
	Santa Isabel					
	Santa Margarita					

Fonte: Sistema de Información Geográfica para Emprendedores (SIGE)

#### 4.3.2 Coleta dos Carrapatos

Os carrapatos foram retirados utilizando pinças hemostáticas, fazendo um movimento rotatório horizontal, cuidando para não separar o corpo da peça bucal (estrutura pela qual estão fixados os carrapatos na pele) coletando-se o maior número possível de carrapatos, respeitando o tempo de contenção física e o estresse do animal. Após a coleta, eles foram conservados e transportados em frascos com etanol 70%.

#### 4.4 TRANSPORTE DO MATERIAL

Um total de 216 amostras de DNA, extraído de sangue total de cães, separadas em alíquotas (0,5 mL aproximadamente) e 135 amostras de carrapatos, com mais de um carrapato por amostra, foram transportadas ao Brasil como "material de risco sanitário insignificante"

seguindo as considerações pertinentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do governo brasileiro, estabelecidas na Instrução Normativa Interministerial nº 32, de 16 de agosto de 2013. DOU de 19/08/2013 (nº 159, Seção 1, pág. 5) (Apêndice 1) (BRASIL, 2013).

## 4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

### 4.5.1 Extração do DNA

#### 4.5.1.1 Extração do DNA do sangue

A extração do DNA do sangue foi realizada em câmara de fluxo laminar vertical contínuo utilizando o Kit Illustra Blood Genomic prep (GE Health Care®) de acordo com as instruções de uso do fabricante, seguindo o seguinte protocolo, resumidamente: adicionou-se 20 µL de solução de Proteinase K (20 mg/mL) em microtubo de 1,5 mL, junto com 200 µL de sangue e 400 µL de solução de lise. Após homogeneização em vortex, a mistura foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após breve centrifugação para retirada dos resíduos da tampa do microtubo, a mistura foi transferida para coluna em tubo coletor e centrifugada por 1 minuto a 16.000 x g. Após descarte do resíduo do tubo coletor, foi adicionado 500 µL de solução de lise, sofrendo centrifugação por 1 minuto a 16.000 x g. O resíduo do tubo coletor foi novamente descartado e foi adicionado 500 µL de tampão de lavagem, centrifugado por 3 minutos a 13.000 x g sendo o resíduo do tubo coletor descartado. A coluna foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, foi adicionado 200 µL de tampão de eluição, pré-aquecido a 70°C e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Após centrifugação por 1 minuto a 16.000 x g, as amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C até o momento da utilização para a PCR.

#### 4.5.1.2 Extração do DNA dos carrapatos

Antes da extração do DNA de cada uma das amostras dos carrapatos, foi feita a lavagem em água destilada estéril por três vezes. Em seguida foi adicionado 200µL de PBS (phosphate buffered saline), sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro de 0,1 mm para a trituração em Minibeadbeater BIOSPEC® por 1 minuto. No mesmo tubo foram acrescentados 200µL de Digest buffer 2X concentrado, 20µL de Proteinase K e 50µL de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) e, em seguida, incubados em banho-Maria a 56°C *overnight* (12 horas).

À amostra digerida, acrescentou-se 550µL de fenol, em capela de exaustão, submetendo-a a centrifugação (16000 x g) por 10-20 minutos. A fase aquosa foi retirada para um tubo novo estéril. Adicionaram 500µL de fenol:clorofórmio (1:1) (em capela de exaustão), submetendo-a a centrifugação (16000 x g) por 10-20 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para um tubo estéril, sendo acrescido 600µL de isopropanol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16000 x g por 10-20 minutos, observando-se a formação do “pellet”. Ao sedimento, foram adicionados 1000µL de etanol absoluto gelado e novamente centrifugados a 16000 x g por 1 minuto. Ao sedimento restante, foram adicionados 1000µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 16000 x g por 1 minuto. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado colocado a 56°C por 15 minutos para secar o álcool e, posteriormente, adicionou-se 50-100µL de TE (Tris-EDTA) 1X e mantido na geladeira (2-8°C) “overnight”. Finalmente, a amostra foi colocada a 56°C por 15 minutos, e logo armazenada no freezer a -20 ou -80°C até o momento do uso (SANTOLIN et al., 2013).

#### **4.5.2 Identificação Morfológica de Ixodídeos**

Os carrapatos recolhidos dos cães durante a contenção foram inicialmente armazenados em etanol 70% em tubos estéreis para o transporte até o Brasil, quando os mesmos foram transferidos para tubos contendo isopropanol absoluto.

Para os carrapatos adultos, a identificação morfológica das espécies foi realizada com base nas chaves dicotômicas de Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al., (2006). A identificação morfológica foi procedida com auxílio de estereoscópio binocular. Os carrapatos foram separados em grupos segundo espécie e sexo. Adultos fêmeas foram armazenados individualmente, os adultos machos em “pool” de até sete exemplares e as ninfas em “pool” de até dez exemplares do mesmo animal e da mesma espécie, armazenados em microtubos de 1,5mL contendo isopropanol absoluto.

#### **4.5.3 Reação em Cadeia da polimerase (PCR)**

##### **4.5.3.1 Controles**

Uma amostra de sobrenadante de cultura de *E. canis*, uma amostra de sangue sabidamente contendo *A. platys*, uma amostra positiva de *R. parkeri* cepa At24, *Babesia* spp., *Babesia vogeli* e *Rangelia vitalii* confirmadas pelo sequenciamento, foram utilizadas

como controle positivo. Para o controle negativo, foi inserido em cada um dos grupos de amostras submetidas à PCR um tubo contendo a água “UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water” (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, EUA) em lugar do DNA alvo, verificando se houve contaminação dos reagentes utilizados na preparação da mistura de reação.

Para garantir a eficácia da extração, todas as amostras de DNA extraída do sangue (216), foram testadas para a presença de DNA amplificável por meio do conjunto de iniciadores GAPDH – F e GAPDH – R (Quadro 11) que proporcionam a amplificação de um fragmento de 399 pares de base do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH), presente em todos os mamíferos (BIRKENHEUER et al., 2003). Condições da PCR encontram-se detalhadas nos Quadros 12 e 13.

**Quadro 11:** Iniciadores utilizados na amplificação de fragmento de aproximadamente 399pb do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase GAPDH F/GAPDH R, presente em todos os mamíferos.

<b>Iniciadores</b>	<b>Seqüências (5' – 3')</b>
GAPDH – F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT
GAPDH – R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC

**Quadro 12:** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para GAPDH F/GAPDH R, a partir de amostras de sangue (Adaptado de: BIRKENHEUER et al., 2003).

<b>Soluções</b>	<b>Volume 1 Reação (µL)</b>
Água livre de nucleases	11,875 µL
Buffer 5x	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µL
dNTPmix 10 mM	0,5 µL
GAPDH – F 10 µM	0,5 µL
GAPDH – R 10 µM	0,5 µL
GoTaq DNA Polymerase 5U/µL	0,125 µL
Amostra	5,0 µL

**Quadro 13:** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para o gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a partir de amostras de sangue (Adaptado de: BIRKENHEUER et al., 2003).

<b>Procedimento da PCR</b>			
<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de execução</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturação	95°C	45 segundos	
Hibridização	55°C	45 segundos	30 ciclos
Polimerização	72°C	45 segundos	
Polimerização Final	72°C	2 minutos	1 ciclo

#### 4.5.3.2 Amplificação de agentes da família Anaplasmataceae

As amostras de DNA positivas no ensaio da PCR para GAPDH (216) e amostras de DNA extraída dos carrapatos (517), foram testadas para identificar agentes da família Anaplasmataceae. Foram utilizados os iniciadores ECB e ECC, que amplificam um fragmento de, aproximadamente, 478 pb da região 16S do RNA ribossomal comum às espécies do gênero *Ehrlichia* e que, também inclui *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *Neorickettsia sennetsu*, *N. risticii* e *N. helminthoeca* (DAWSON et al., 1994, 1996) (Quadro 25). Condições da PCR encontram-se detalhadas nos Quadros 14 e 15.

**Quadro 14:** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para ECB/ECC, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: DAWSON et al., 1994, 1996).

<b>Soluções</b>	<b>Volume 1 Reação (µL)</b>
Água livre de nucleases	11,875 µL
Buffer 5x	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µL
dNTPmix 10 mM	0,5 µL
ECC 10 µM	0,5 µL
ECB 10 µM	0,5 µL
GoTaq DNA Polymerase 5U/µL	0,125 µL
Amostra	5,0 µL

**Quadro 15:** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para ECC/ECB, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: DAWSON et al., 1994, 1996).

Fase	Procedimento da PCR		
	Temperatura	Tempo de execução	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1 ciclo
Desnaturação	95°C	1 minuto	30 ciclos
Hibridização	65°C	2 minutos	
Polimerização	72°C	2 minutos	
Polimerização Final	72°C	7 minutos	1 ciclo

#### 4.5.3.3 PCR e nested-PCR para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*

As amostras de DNA extraído do sangue (40) e carrapatos (78), positivas na PCR para ECC/ECB, foram testadas pela nested-PCR para a presença de *E. canis* e *A. platys*, mediante o uso de iniciadores que amplificam uma região do gene 16S rRNA. Para a primeira reação foram utilizados os iniciadores que amplificam um fragmento de “conservado” de 478 pb da família Anaplasmataceae (DAWSON et al., 1994, 1996), condições da PCR (Quadros 14 e 15). Para a segunda reação foram utilizados os “iniciadores” ECAN/HE3 para amplificação *E. canis*-específica (DAWSON et al., 1996; MURPHY et al., 1998), e PLATYS/HE3 para a amplificação *A. platys*-específica (BROWN et al., 2001) (Quadro 25). Condições da PCR encontram-se detalhadas nos Quadros 16 e 17.

**Quadro 16:** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para ECAN/HE3 e PLATYS/HE3, a partir do produto do primeiro round (Adaptado de: DAWSON et al., 1996; MURPHY et al., 1998; BROWN et al., 2001)

Soluções	Volume 1 Reação (µL)
Água livre de nucleases	15,875 µL
Buffer 5x	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µL
dNTPmix 10 mM	0,5 µL
ECAN/PLATYS 10 µM	0,5 µL
HE3 10 µM	0,5 µL
GoTaq DNA Polymerase 5U/µL	0,125 µL
Amostra	1,0 µL



**Quadro 17:** Temperaturas e tempos das fases usadas na Nested PCR, para ECAN/HE3 e PLATYS e HE3, a partir de amostras de sangue e carrapatos (DAWSON et al., 1996; MURPHY et al., 1998; BROWN et al., 2001).

<b>Procedimento da PCR</b>		
<b>Número Total de Ciclos</b>	40 ciclos	
<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de execução</b>
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
3 Ciclos		
Desnaturação	94°C	1 minuto
Hibridização	55°C	2 minutos
Polimerização	72°C	1.5 minutos
37 Ciclos		
Desnaturação	92°C	1 minuto
Hibridização	55°C	2 minutos
Polimerização	72°C	1.5 minutos
Polimerização Final	72°C	5 minutos

#### 4.5.3.4 PCR para Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa

As amostras de DNA extraído dos carrapatos (517), foram testadas pela PCR, para presença de agentes rickettsiales. Nas reações foram utilizados os iniciadores RpCS.877p/RpCS.1258n, Rr190.70p/Rr190.602n, BG1-21/BG2-20, 17kD5/17KD3 (Quadro 25), que amplificam fragmentos de, aproximadamente, 381pB, 532pb, 650pb e 549pb dos genes *gltA*, *ompA*; *ompB* e *htrA* respectivamente (REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994; LABRUNA et al., 2004). Condições da PCR para *ompA*, *ompB* e *gltA* encontram-se detalhadas nos Quadros 18 e 19 e para *htrA* nos Quadros 20 e 21.

**Quadro 18:** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação dos genes *ompA*; *ompB* e *gltA*, a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994).

<b>Procedimento da PCR</b>			
<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de execução</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturação	95°C	40 segundos	
Hibridização	55°C	1 minuto	40 ciclos
Polimerização	72°C	1 minuto 10 segundos	
Polimerização Final	72°C	7 minutos	1 ciclo

**Quadro 19:** Volume das soluções usadas na PCR, para amplificação dos genes *ompA*, *ompB* e *gltA*, a partir de amostras de carrapatos (REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994).

Soluções	Volume 1 Reação (µL)
Água livre de nucleases	10,25 µL
Buffer 5x	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3,0 µL
dNTPmix 10 mM	0,5 µL
Iniciador 1 10 µM	0,5 µL
Iniciador 2 10 µM	0,5 µL
GoTaq DNA Polymerase 5U/µL	0,25 µL
Amostra	5,0 µL

**Quadro 20:** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação do gene *htrA* a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: LABRUNA et al., 2004).

Soluções	Volume 1 Reação (µL)
Água livre de nucleases	9,35 µL
Buffer 5x	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,5 µL
dNTPmix 10 mM	2,0 µL
Iniciador 1 10 µM	2,0 µL
Iniciador 2 10 µM	2,0 µL
GoTaq DNA Polymerase 5U/µL	0,15 µL
Amostra	2,0 µL

**Quadro 21:** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, para amplificação do gene *htrA* a partir de amostras de carrapatos (Adaptado de: LABRUNA et al., 2004).

Fase	Procedimento da PCR		
	Temperatura	Tempo de execução	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturação	95°C	20 segundos	40 ciclos
Hibridização	56°C	20 segundos	
Polimerização	72°C	25 segundos	
Polimerização Final	72°C	5 minutos	1 ciclo

#### 4.5.3.5 PCR para detecção de Piroplasmas

As amostras de DNA positivas no ensaio da PCR para GAPDH (216) e amostras de DNA extraída dos carrapatos (517), foram testadas para identificar agentes para a detecção de DNA específico de piroplasmídeos. Na reação foram utilizados os iniciadores PIRO A/PIRO B (Quadro 25) que amplifica fragmento de, aproximadamente, 400 pb do gene do RNA ribossomal 18S de quase todas as espécies de piroplasmas (CARRET et al., 1999). Condições da PCR encontram-se detalhadas nas Quadros 22 e 23.

**Quadro 22:** Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase, para PIRO A/PIRO B, a partir de amostras de sangue e de carrapatos (Adaptado de: CARRET et al., 1999).

<b>Soluções</b>	<b>Volume 1 Reação (µL)</b>
Água livre de nucleases	11,625 µL
Buffer 5x	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,625 µL
dNTPmix 10 mM	0,5 µL
Iniciador 1 10 µM	0,5 µL
Iniciador 2 10 µM	0,5 µL
GoTaq DNA Polymerase 5U/µL	0,25 µL
Amostra	5,0 µL

**Quadro 23:** Temperaturas e tempos das fases usadas na reação em cadeia da polimerase, PIRO A/PIRO B, a partir de amostras de sangue e carrapatos (Adaptado de: CARRET et al., 1999).

<b>Fase</b>	<b>Procedimento da PCR</b>		
	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de execução</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturação	94°C	1 minuto	30 ciclos
Hibridização	55°C	1 minuto	
Polimerização	72°C	1 minuto	1 ciclo
Polimerização Final	72°C	5 minutos	

#### 4.5.3.6 Restrição Enzimática

As amostras de DNA positivas no ensaio da PCR para PIRO A/PIRO B foram avaliadas pela técnica de RFLP, com as enzimas *Hinf* I (Biolabs®, New England) e *Taq* I (Biolabs®, New England) (CARRET et al., 1999) para diferenciar as três espécies de *B. canis sensu lato*, através do corte enzimático em sítios específicos dependendo da espécie em questão, como descrito no Quadro 24.

A RFLP foi realizada com 10µL dos produtos amplificados da PCR para PIRO A/PIRO B com 10 unidades (1µL) de *Hinf* I (Biolabs®, New England) e 10 unidades (1µL) de *Taq* I (Biolabs®, New England) e seus respectivos tampões, em tubos de reações separados, resultando em uma solução com volume final de 20µL.

A digestão enzimática para a enzima *Taq* I foi realizada em termociclador programável a 65°C (Applied Biosystems® Veriti®) e em um —dry block (Solab SL20®) a 65°C para a enzima *Hinf*, ambos por uma hora. Em seguida, foi realizada a eletroforese.

**Quadro 24.** Resultados esperados dos tamanhos de fragmentos de DNA (pb) na PCR e restrição enzimática para cada espécie de piroplasma.

Espécies de piroplasmas	Tamanho do fragmento de DNA (pb)-PCR	PCR – Restrição enzimática		Características da restrição enzimática
		Taq I (pb)	Hinf I (pb)	
<i>B. canis</i>	408	408	408	TaqI(-) HinfI(-)
<i>B. vogeli</i>	407	20 + 175 + 210	407	TaqI(+) HinfI(-)
<i>B. rossi</i>	408	408	175 + 230	TaqI(-) HinfI(+)
<i>B. gibsoni</i>	406	406	200 + 205	TaqI(-) HinfI(+)
<i>Theillera annae</i>	440	50 + 390	70 + 370	TaqI(+) HinfI(+)
<i>Rangelia vitalii</i> *	397	397	203 + 193	TaqI(-) HinfI(+)

(+) ocorre clivagem; (-) não ocorre clivagem.

Fonte: Solano-Gallego et al. (2008) e \*Lemos et al. (2012).

#### **4.5.4 Cuidados gerais**

Evitando o risco de contaminação, visto que a técnica da nested-PCR é muito sensível, o preparo do mix foi realizado em capela de fluxo laminar. Foram utilizadas somente ponteiras com filtro e pipetas utilizadas limpas, antes de cada reação, com etanol 70%. Todo o material utilizado foi esterilizado, antes de cada reação, com luz ultravioleta por 30 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

#### **4.5.5 Visualização dos produtos de amplificação**

Para revelação dos resultados, os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,5% para eletroforese. Para revelar as bandas produzidas, o gel foi corado com GelRed™ visualizado sob luz ultra-violeta. Para determinação dos tamanhos dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, EUA).

#### **4.5.6 Purificação**

As amostras positivas foram purificadas com o kit comercial ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as instruções do fabricante, no Laboratório de Pesquisa Clínica e Molecular Marcílio Dias do Nascimento da Universidade Federal Fluminense (LAMADIN/UFF)

#### **4.5.7 Reação de Sequenciamento**

O DNA purificado e os conjuntos de iniciadores, das amostras positivas para RpCS.877p/RpCS.1258n, Rr190.70p/Rr190.602n, BG1-21/BG2-20 e PIRO A/PIRO B, foram encaminhados para a Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz, utilizando o sistema da Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA – PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A) (OTTO et al., 2008). Já o DNA purificado, das amostras positivas para ECC/ECB, ECAN/HE3 e PLATYS/HE3, foi sequenciado no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, usando o protocolo *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* com polímero POP7, seguindo as especificações do fabricante, no sequenciador 3130/3130X/Genetic Analyzer Applied Biosystems Hitachi USA 850 Lincoln Drive Foster City CA94404USA. utilizando-se o kit comercial “Big

DyeTerminator® v 3.1 CycleSequencing Kit” (AppliedBiosystems®, CA, USA), utilizando os iniciadores descritos no Quadro 25.

Na análise filogenética das sequências positivas para agentes da família Anaplasmataceae, Ordem Piroplasmida e do gênero *Rickettsia*, foram alinhadas usando o programa Clustal W versão 2.1 (LARKIN, 2007), e os —gaps do alinhamento foram removidos, em seguida uma análise filogenética foi efetuada através do pacote PHYLIP - Phylogeny Inference Package (FELSENSTEIN, 2005), utilizando-se uma análise de máxima parcimônia com um número de —bootstrap de 1000, e uma árvore consenso foi gerada (os programas utilizados foram Seqboot, Dnapars e Consense). O processamento gráfico da árvore foi realizado utilizando-se o programa Mega versão 6.06.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a associação dos resultados da PCR com as dados da ficha do animal (Anexo 3), como o sexo, idade, região de procedência e presença de carrapatos.

As variáveis binárias foram analisadas pelo teste de Fisher e as variáveis de idade e estrato socioeconômico pelo teste de regressão binária logística, com nível de significância de 95% de confiança, para observação de possíveis diferenças significativas entre as frequências encontradas nos resultados da PCR e as diferentes variáveis mencionadas anteriormente. As análises foram realizadas com o auxílio dos programas computacionais BioEstat 5.0 e Stata versão 13 (statistics/Data Análises).

Além disso, para análise epidemiológica dos dados foi calculado o fator de risco, mediante razão de prevalência, com o auxílio do programa computacional BioEstat 5.0.

**Quadro 25.** Iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR para a detecção de agentes de membros Ordem Rickettsiales e agentes da Ordem Piroplasmida

	Gene	Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Fam. Anaplasmataceae	16S rRNA	ECC	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC	478	Dawson et al., 1994, 1996
		ECB	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA		
<i>E. canis</i>	16S rRNA	ECAN5	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	398	Dawson et al., 1996
		HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT		
<i>A. platys</i>	16S rRNA	PLATYS	GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG	398	Murphy et al., 1998; Brown et al, 2001
		HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT		
Rickettsias RGFM	<i>gltA</i>	RpCS.877p	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	381	Regnery et al., 1991
		RpCS.1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
	<i>ompA</i>	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532	Regnery et al., 1991
		Rr190.602n	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT		
	<i>ompB</i>	BG1-21	GGCAATTAATATCGCTGACGG	650	Eremeeva et al., 1994
		BG2-20	GCATCTGCACTAGCACTTTC		
	<i>htrA</i>	17KD5	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	549	Labruna et al, 2004
		17KD3	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC		
<i>Babesia</i> spp.	18S rRNA	PIRO A	AATACCCAATCCTGACACAGGG	400	Carret et al., 1999
		PIRO B	TTAAATACGAATGCCCCCAAC		

pb = pares de base

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contribuição mais importante deste trabalho, em relação ao tema das hemoparasitoses no Peru, foi a pesquisa molecular desenvolvida, cujos resultados permitiram relatar pela primeira vez a presença de agentes da família Anaplasmataceae, agentes Rickettsiais e agentes da Ordem Piroplasmida em cães, e seus carrapatos, da região Metropolitana de Piura. Os resultados no presente estudo demonstraram que a associação da detecção por PCR com o sequenciamento genético e análise filogenética, auxiliam no aumento da sensibilidade das técnicas empregadas no diagnóstico das rickettsias e da babesiose caninas, permitindo a análise de similaridade com outras sequências armazenadas no GenBank, permitindo resolver com maior clareza as relações filogenéticas entre as sequências obtidas, levando a uma identificação mais precisa da espécie a que elas pertencem.

### 5.1 CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA DOS CARRAPATOS

Dos 984 carrapatos, apenas três espécies de carrapatos foram identificadas, sendo 977 *Rhipicephalus sanguineus* (180 ninfas, 410 fêmeas e 387 machos), 6 fêmeas da espécie *Amblyomma triste* e um macho *Amblyomma tigrinum*. Estes foram classificados morfolologicamente por estágio, espécie e sexo, ficando: 67,3% (348/517) fêmeas adultas (armazenadas individualmente), 22,8% (118/517) machos adultos (armazenados em “pool” de até sete exemplares) e 9,9% (51/517) ninfas (armazenadas em “pool” de até dez exemplares do mesmo animal e da mesma espécie). Como observado neste trabalho, *R. sanguineus* domina infestações em áreas urbanas, corroborando a literatura (DANTAS- TORRES et al., 2004; LABRUNA et al., 2005; SZABÓ et al., 2010). Estes ixodídeos são carrapatos de hábitos nidícola, passando as fases de vida livre em pequenos orifícios e superfícies de cimento e madeira ou locais de repouso de seu hospedeiro (LABRUNA et al., 2004).



41,2% (89/216) dos cães pertenciam a proprietários de nível socioeconômico alto e médio alto. O baixo número de carrapatos observado no momento da coleta, mesmo na época de verão, se deveu provavelmente ao hábito dos mesmos proprietários de dar banho em seus animais assim como a tratamento preventivo contra ectoparasitos.

## 5.2 FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE

### 5.2.1 Amostras do sangue dos cães

A frequência de cães positivos para ECC/ECB, mediante PCR, foi 18,5% (40/216) na Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru (Tabela 2). Já pela Nested PCR das amostras positivas para ECC/ECB, utilizando os iniciadores ECAN/HE3 e PLATYS/HE3 para amplificação de *E. canis*-específica e *A. platys*-específica respectivamente, revelou-se que 52,5%(21/40) e 35,0% (14/40) das amostras positivas para ECC/ECB, foram positivas para *E. canis* e para *A. platys*, respectivamente. É importante mencionar que no presente estudo houveram casos de coinfeção entre espécies da Família Anaplasmatocae, os quais representam 20% (8/40) do total de animais positivos. Além disso, 32,5%(13/40) das amostras positivas para ECC/ECB, não foram positivas, pela Nested-PCR, nem para *E. canis*-específica e *A. platys*-específica. Não obstante, o sequenciamento e análise filogenética permitiram confirmar os resultados da PCR e Nested-PCR dos agentes envolvidos, além de identificar as espécie das 13 sequências que não puderam ser identificadas pela PCR (Tabela 1). No presente estudo, as técnicas de PCR e sequenciamento constataram por amplificação de DNA de caninos, a presença de *E. canis* e *A. platys* dos cães avaliados. Estes resultados mostram que estamos diante de duas doenças endêmicas na Região Metropolitana da Província de Piura-Peru.

Estudos realizados na América do Sul, utilizando técnicas moleculares, apontaram percentuais de positividade variados na infecção por agentes da Família Anaplasmatocae. No Brasil, Dagnone et al. (2003), reportaram 21,7% de positividade em Londrina no Paraná. Em São Paulo, Bulla et al. (2004), Ueno et al. (2009) e Santos et al. (2009a) demonstraram frequências de 30,9% , 40% e 38,9% respectivamente. No estado de Pernambuco, um estudo conduzido por Ramos et al. (2009) revelou um percentual de 57%, e no Rio de Janeiro-RJ, o percentual observado foi de 15,84% (Ferreira et al., 2007). Na Argentina, Colômbia e Venezuela, utilizando técnicas moleculares, foram reportadas frequências de 6,9% (6/86),

58,9% (23/39) e 35% (17/51), respectivamente (UNVER et al., 2003; EIRAS et al., 2012; VARGAS-HERNÁNDEZ et al., 2012).

Já no Peru, no Hospital de Ensino Veterinário da Universidade de San Marcos no Departamento de Lima, o soro de vinte e cinco cães com sinais clínicos compatíveis com *Ehrlichia* sp. foi testado para *E. canis*, usando kit comercial. Todas as 25 amostras foram positivas para *E. canis* para o teste de ELISA. Além disso, mediante multiplex PCR em tempo real (MRT-PCR), amplificando uma região variável do gene rRNA 16S, foi utilizado para detectar *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*. Onze das 25 amostras de sangue testadas foram positivas para *E. canis* e nenhuma das amostras foi positiva para *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. platys* ou *A. phagocytophilum* (VINASCO et al., 2007). Na mesma região, Adrianzen et al. (2003) e Hoyos et al. (2007), mediante os testes de ELISA reportaram frequências de 16,5% (23/140) e 75,32% (58/77), respectivamente.

Fatores no delineamento da investigação como: metodologias utilizadas para o diagnóstico, regiões geográficas avaliadas, período da amostragem e estágio do vetor, podem ajudar a explicar a grande variação nas frequências e presença de agentes observados nos diferentes trabalhos.

No presente trabalho, apesar da coleta das amostras ter sido realizada independentemente do estado clínico do animal, certificou-se que em nenhum desses animais se estava administrando algum medicamento, pelo proprietário ou veterinário. Esta informação foi registrada no momento da coleta das amostras (Anexo3) e garante que a susceptibilidade dos animais estudados à infecção é representativa.

Alguns estudos demonstraram que a doença pode ser mais severa com algumas cepas de *E. canis* e na coinfeção com *E. canis* e outros hemoparasitos (CASTRO et al., 2004; SANTOS et al., 2009a; UNVER et al., 2009). A coinfeção entre *E. canis* e *A. platys* tem sido relatado na literatura com frequências de 29 e 30% na Venezuela e no Brasil (HUANG et al., 2005; SILVA et al 2010). No presente estudo os casos de coinfeção, confirmados pelo sequenciamento, entre agentes da família Anaplasmataceae foi de 15%(6/40), destes 66%(4/6) coinfeção de *E. canis* e *A. platys* e 34%(2/6) coinfeção de *E. canis* e *Ehrlichia* sp.

**Tabela 1:** Resultados da PCR e sequenciamento para agentes da Família Anaplasmataceae em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura, Piura-Peru, 2017

Animal n°	GAPDH-F	GAPDH-R	ECC-F ECB-R	ECAN-F HE3-R	Platys-F HE3-R	Sequenciamento
31	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>A. platys</i>
56	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>A. platys</i>
59	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>E. canis</i>
62	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
63	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
64	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
66	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
69	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
72	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
73	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>A. platys</i>
76	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>A. platys</i>
80	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
97	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis, Ehrlichia. sp.</i>
98	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>A. platys</i>
101	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
114	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>A. platys</i> , Não amplificou
115	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis, A. platys</i>
116	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>A. platys</i>
117	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
118	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Ehrlichia. sp.</i> Não amplificou
130	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis, A. platys</i>
132	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
134	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	<i>A. platys</i>
136	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
145	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
146	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
151	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>E. canis</i>
152	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
153	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>A. platys</i>
156	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
169	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
170	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
171	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis, A. platys</i>
178	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
179	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis, A. platys</i>
185	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>A. platys</i>
186	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
191	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
196	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>E. canis</i>
203	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis, A. platys</i>

Considerando a localização da região estudada, o distrito de Castilla no Departamento de Piura, a frequência relativa foi de 45% (22/40) (Tabela 3), sendo o bairro de Tacalá com maior número de positivos no Distrito de Castilla. Já no Distrito de Piura a frequência relativa foi de 45% (18/40) (Tabela 3), sendo o bairro de Santa Margarita com maior número de positivos no Distrito de Piura. Considerando resultados globais e ao mesmo tempo o estrato socioeconômico na Região Metropolitana da Província de Piura, os bairros que pertencem ao estrato socioeconômicos médio baixo, apresentaram uma maior frequência 55% (22/40) quando comparados com os outros estratos (Figura 12).

Ao se considerar as variáveis de faixa etária, sexo, presença de carrapatos, estrato socioeconômico e convivência com outros animais, verificou-se que houve associação entre os diferentes grupos e a infecção por agentes da Família *Anaplasmataceae* mediante os testes estatísticos de Regressão binária logit e exato de Fisher. Este fato, apenas não foi observado em relação a variável convivência e faixa etária ( $p=0,1074$ ) (Tabela2).

Na variável sexo, se observou uma frequência de positivos maior nos machos, sendo 24,5% e 14,0% em machos e fêmeas, respectivamente, (Tabela 2). A relação entre esta variável e a infecção para agentes da Família *Anaplasmataceae* demonstrou significância ( $p=0,034$ ), apesar de outras pesquisas não observaram diferenças entre sexo (AGUIAR et al., 2007; SILVA et al., 2010). Já, Costa Jr et al. (2007) encontraram um maior número de machos que fêmeas, explicando-se que a elevada frequência nos machos é pelos hábitos territoriais associados a eles.

Ao se considerar a variável idade, apesar de não se observar significância entre as diferentes faixas etárias, podemos inferir que a menor idade, o animal tem maior chances de apresentar infecção comparado com os adultos ( $> 1$  ano) (Tabela 2). Estes resultados são similares aos de Ueno et al. (2009) e Witter et al. (2013), que reportaram uma maior frequência em cães com idade até 12 meses, em estudos realizados em São Paulo e Mato Grosso respectivamente. O fato se explica segundo, os autores, pois cães menores de um ano de idade estão mais susceptíveis a contraírem a infecção e apresentarem o agente circulante, decorrentes de alta infestação por carrapatos.

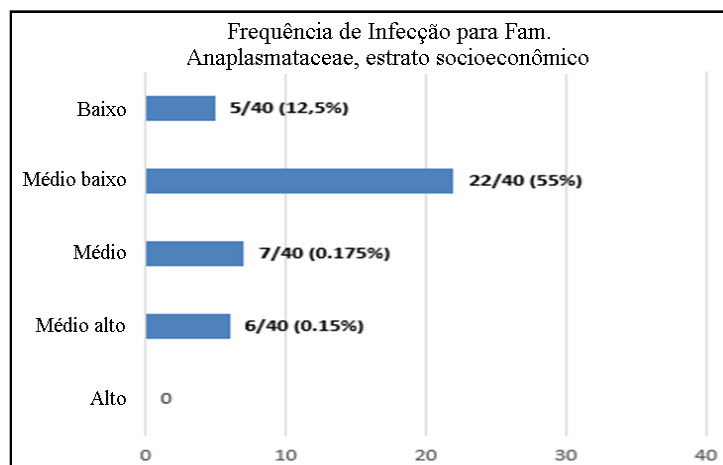
Avaliando a presença de carrapatos como risco de infecção, observou-se associação entre esta variável e a infecção para agentes da Família *Anaplasmataceae* ( $p=0,001$ ). Analisando a variável do estrato socioeconômico observou-se que houve associação entre esta variável e a infecção para agentes da Família *Anaplasmataceae* ( $p=0,001$ ). Além disso, o

estrato socioeconômico médio baixo, apresentou maior número de infectados 29,7% (Tabela 3, Figura 12), inferindo que cães domiciliados em bairros de menor estrato socioeconômico, cujos ambientes são quintais geralmente compostos unicamente por terra, apresentaram maior frequência. Estes ambientes favorecem o contato dos cães com o vetor, pois proporcionam biótopos propícios para a manutenção de *R. sanguineus* (SOARES et al., 2006). A falta no cuidado periódico destes ambientes, associado a falhas nas medidas sanitárias como tratamentos profiláticos no controle a ectoparasitas, podem acrescentar os riscos de infecção, devido ao fato que *R. sanguineus* tem o hábito de se ocultar em pequenos orifícios e superfícies de cimento e madeira (LABRUNA e PEREIRA, 2001). Este fato, além das condições ambientais, sobretudo o clima da região estudada, propiciam a proliferação dos carrapatos e, conseqüentemente, a disseminação de agentes como *E. canis*, *A. platys* e *B. vogeli* em cães desta região, como foi demonstrado neste estudo.

**Tabela 2.** Frequências absolutas e relativas de infecção por agentes da Família Anaplasmataceae, mediante PCR, segundo as variáveis de sexo, faixa etária, convivência com outros animais, estrato socioeconômico e presença de carrapatos em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura, Piura-Peru, 2017

Variável	Total	Positivo	Freq. Rel %	p-valor	Risco	IC 95%
	216	40	18,5	0	0	0
<b>Sexo</b>						
Macho	106	26	24,5	0,034	1,93	1,07-3,49
Fêmea	110	14	14			
<b>Faixa etária</b>						
< 1 ano	50	12	24	0,095	NC	NC
1-7 ano	145	24	16,6			
> 7 ano	21	4	19			
<b>Convivência</b>						
Sim	129	19	14,7	0,1074	0,61	0,35-1,07
Não	87	21	24,1			
<b>Estrato Soc.</b>						
Alto, medio alto e medio	122	13	10,6	0,001	2,7	1,47-4,93
Médio, medio baixo e baixo	94	27	28,7			
<b>carrapato</b>						
Sim	132	35	26,5	0,0001	4,45	1,82-10,92
Não	84	5	6			

IC: Intervalo de confiança, NC: não calculado (Devido ao valor de  $p > 0,05$ )



**Figura 12.** Resultados da frequência da infecção para agentes da Família Anaplasmatidae, mediante PCR, em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru, de acordo com Estrato Socioeconômico.

**Tabela 3.** Frequências absolutas e relativas de infecção para agentes da Família Anaplasmatidae, mediante PCR, segundo os bairros e estrato socioeconômico em caninos provenientes da Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru, 2017.

Distrito	Bairro	Estrato socioeconômico	Positivos	Frequência relativa %
<b>Castilla</b>	Ayacucho	Médio	0	0
	Campo polo	Médio baixo	6	15
	Miraflores	Alto	0	0
	Tacalá	Médio baixo	16	40
<b>Piura</b>	Piura centro	Médio alto	1	2,5
	Enace	Baixo	5	12,5
	Las Mercedes	Médio alto	2	5
	Los Cocos	Alto	0	0
	Ricardo Jauguero	Médio	3	7,5
	Rio sol	Baixo	0	0
	San José	Médio alto	3	7,5
	Santa Ana	Alto	0	0
	Santa Isabel	Alto	0	0
	Santa Margarita	Médio	4	10
<b>Total</b>			40	100%

Na análise filogenética das seqüências positivas para agentes da família Anaplasmatidae. As seqüências utilizadas na comparação foram escolhidas por se agruparem no mesmo clado de *E. canis* e *A. platys* na filogenia proposta por Almazan et al. (2016), além de outras seqüências que serviram de comparação por serem outras espécies de da

família Anaplasmataceae. As sequências *Neorickettsia helminthoeca* (U12457), *N. risticii* (AF036649) e *N. sennetsu* (M73225) foram escolhidas como outgroup por pertencerem a um clado diferente ao das espécies de *E. canis* e *A. platys* avaliadas. As sequências deste estudo foram depositadas no Genbank e receberam os seguintes códigos de acesso:

- *Ehrlichia* sp.: MF153979, MF153980
- *Anaplasma platys*: MF153981, MF153971, MF153974, MF153976, MF153969, MF153982, MF153978, MF153968, MF153967, MF153973, MF153970, MF153972, MF153975, MF153983, MF153977.
- *Ehrlichia canis*: MF153966, MF153964, MF153954, MF153963, MF153943, MF153956, MF153960, MF153961, MF153962, MF153955, MF153959, MF153951, MF153957, MF153942, MF153944, MF153953, MF153965, MF153958, MF153945, MF153947, MF153952, MF153946, MF153948, MF153950, MF153949.

Dos 48 produtos sequenciados, das amostras positivas na PCR para agentes da Família Anaplasmataceae, conseguiram-se sequências de boa qualidade pelo método *Sanger* em 87,5%(42/48) dos produtos. Em seis destes produtos obteve-se sequências de baixa qualidade o que impossibilitou a identificação das espécies por esta técnica (Tabela 1). Análise filogenética, permitiu confirmar a presença de *E. canis*, *A. platys* e coinfeção por estes dois agentes. Entretanto, após a análise filogenética, dois dos produtos, identificados como MF153979 e MF153980, não puderam ser agrupados nos clados nem de *E. canis* nem de *A. platys*, ficando classificados como *Ehrlichia* sp. (Figura 13). Para uma melhor caracterização dessas espécies e poder compará-las com outras espécies documentadas nos bancos de dados públicos, ou até identificar possíveis mutações ou erros nas sequências, seria conveniente realizar a análise filogenética de um fragmento maior do gene 16S rRNA ou a utilização de outros genes como: *groESL*, *gltA* e *rop* (subunidade- $\beta$  da RNA polimerase) (DUMLER et al., 2001; TAILLARDT-BISCH et al., 2003).

O dendograma filogenético formado demonstra que a maioria das amostras positivas para *E. canis* (Grupo I) agruparam-se em um grande clado juntamente com as amostras-padrão de *E. canis* de Japão (AF536827), Espanha (AY394465), Brasil (EF195134), Taiwan (GU810149) e Venezuela (KJ513197) (Figura 13). A formação de um outro grande clado foi observada com as amostras positivas para *E. canis* (Grupo II) juntamente com a sequência de

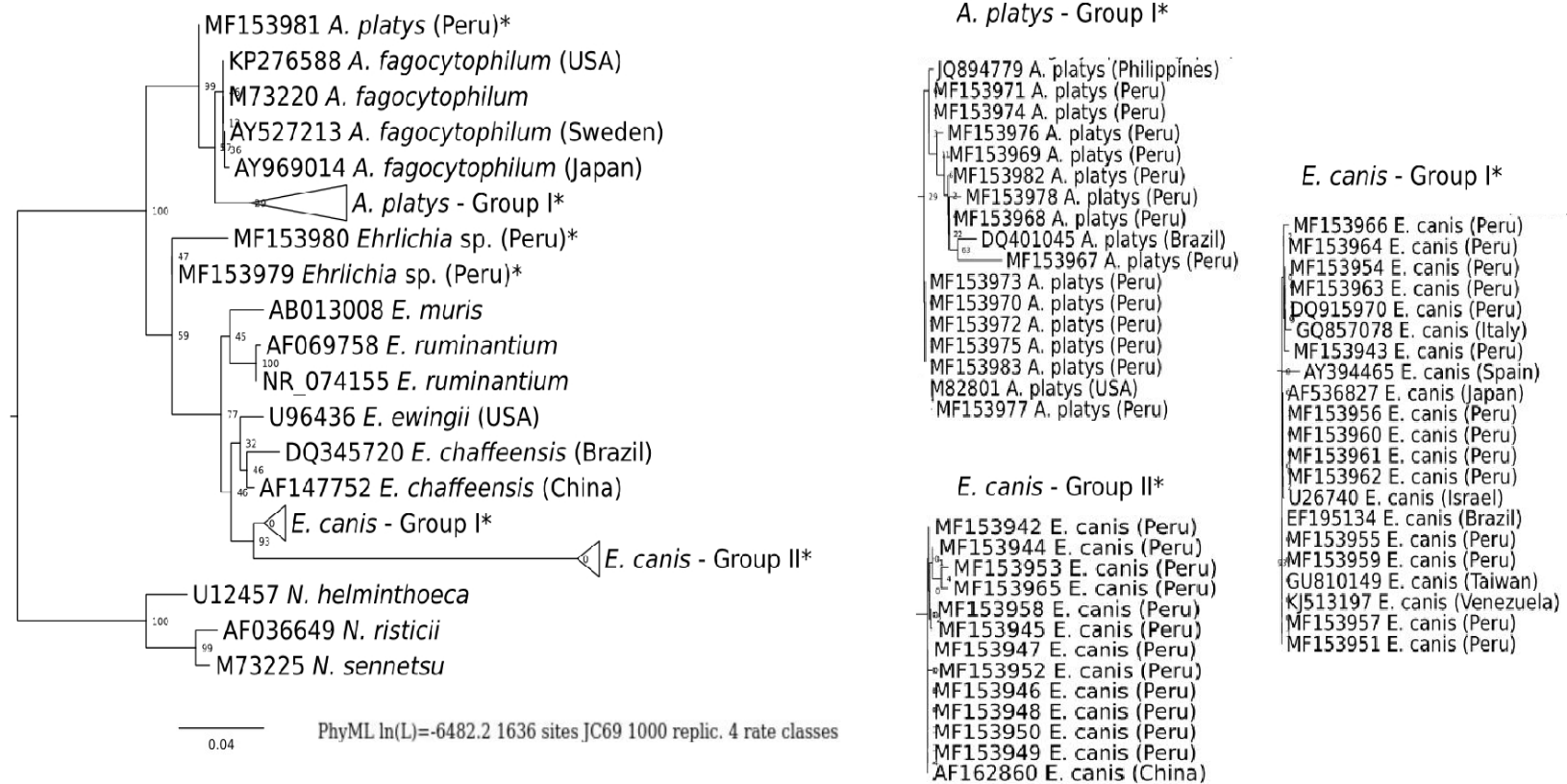
*E. canis* da China. Apesar disso, a identidade entre as sequências dos clados I e II é igual ou superior 99%.

No referente ao gênero *Anaplasma*, a maioria das amostras positivas para *A. platys* agruparam-se em um grande clado (Grupo I) juntamente com a sequência de *A. platys* de USA (M82801), Brasil (DQ401045) e Filipinas (JQ894779), que pôde ser visualizada pelo dendograma (Figura 13). Também se observou, que entre as sequências estudadas para *A. platys* se notou uma identidade igual ou superior a 99%. A sequência de *A. platys* (número de acesso MF153951) ficou fora desse grupo principal, porém com uma identidade de 99% com o mesmo.

Na análise filogenética das seqüências parciais da porção 16S do gene rRNA de amostras positivas para agentes da Família Anaplasmataceae observou-se que as sequências: MF153942, MF153948, MF153951, MF153954, MF153963, MF153964, MF153944, MF153945, MF153946, MF153947, MF153955, MF153958, MF153956, MF153957, MF153959, MF153960, MF153961, MF153943, MF153949, MF153950, MF153952, MF153953, MF153962, MF153965 e MF153966 se agruparam no clado de *E. canis*, demonstrando uma identidade de 99-100%, encontradas pelo Blast, com o isolado de *E. canis* obtido na Malásia (KR920044).

Por outro lado, observou-se que as sequências: MF153971, MF153974, MF153982 e MF153968 se agruparam no clado de *A. platys*, demonstrando uma identidade de 99-100% com a sequência externas do BLAST referente à *A. platys* de Portugal (número de acesso KX180944). Já as sequências MF153970, MF153972, MF153973 e MF153973, também reconhecidas como *A. platys* pela análise filogenética, evidenciaram uma identidade 100% com o isolado de *A. platys* do Brasil (KC109446), do mesmo modo, a sequência MF153969 demonstrou uma identidade de 100% com o isolado de *A. platys* da Croácia (KY114935). Além disso, observou-se que as sequências MF153967, MF153976 e MF153978 demonstraram uma identidade de 97, 99 e 100%, respectivamente, com o isolado de *A. platys* da Índia (KX818218). Finalmente, as sequências MF153977 e MF153981, também reconhecidas como *A. platys*, evidenciaram uma identidade de 100%, encontradas pelo Blast, com o isolado de *A. platys* de Trinidad e Tobago (KY010670) (Figura 13).





**Figura 13:** Dendograma filogenético baseada na sequência parcial da porção 16S do gene rRNA de amostras positivas para ECC/ECB, ECAN/HE3 e PLATYS/HE3, na região metropolitana da província de Piura-Peru, e sequências similares obtidas através de acesso ao “Gen Bank”, mostrando os valores de “Bootstrap” obtidos após 1000 re-amostragens. A barra de escala representa a diferença (número de nucleotídeos) de cada agente dentro de cada ramo. As sequências marcadas com (Peru)\* são amostras deste estudo, que foram positivas na PCR e confirmados através do sequenciamento.

Muitas vezes, o principal problema encontrado é a comparação de seqüências do gene 16S RNA obtidas, com aquelas disponíveis nos bancos de dados públicos, bem como a avaliação e análise filogenética de seqüências de tamanhos distintos, e inferir sobre o relacionamento entre os organismos estudados. Não obstante, a evolução da Bioinformática permitiu a análise de seqüências, mediante o uso de programas de alinhamento e análise filogenética, permitindo uma análise mais abrangente e com menor possibilidade de erros.

### 5.2.2 Amostras dos Carrapatos

A frequência de carrapatos positivos para ECC/ECB, mediante PCR, foi 15,0% (78/517) na Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru. Já pela Nested PCR das amostras positivas para ECC/ECB, utilizando os iniciadores ECAN/HE3 e PLATYS/HE3 para amplificação de *E. canis*-específica e *A. platys*-específica respectivamente, revelou-se que 42,3%(33/78) e 46,1% (36/78) das amostras, foram positivas para *E. canis* e *A. platys*, respectivamente. Os casos de coinfeção entre espécies da Família Anaplasmataceae, representaram 28,2%(22/78) do total das amostras positivas. Curiosamente 39,7%(31/78) das amostras positivas para ECC/ECB, não foram positivas, pela Nested-PCR, nem para *E. canis*-específica nem para *A. platys*-específica. Este fato foi observado também nas amostras do sangue dos cães. Entretanto, pelo sequenciamento e análise filogenética, não conseguiu-se reconhecer o agente envolvido.

O gene rRNA 16S é uma molécula altamente conservada e ubíqua, presente em todos os procariotos, sendo altamente favorável para caracterização espécies em comunidades de bactérias. O 16S rRNA é uma molécula grande e forma parte do ribossomo que é constituído por uma subunidade maior, constituída pelas moléculas ribossomais de 23S e 5S e mais 31 proteínas, assim como de uma subunidade menor, formada pela molécula de RNA ribossomal de 16S além de 21 proteínas (WOODSON e LEONTIS, 1998). É possível, a partir dessas seqüências, elaborar *oligonucleotídeos iniciadores “universais”* para regiões conservadas no início e no final do gene. Estes iniciadores podem ser utilizados para amplificar, via PCR, as seqüências internas do gene, contendo regiões variáveis (NAKATSU et al., 2000; BAKER et al., 2003). Embora o gene 16S rRNA seja útil na classificação de bactérias, algumas dificuldades são reportadas na identificação para gênero e espécie: espécies compartilhando seqüências 16S rRNA similares e/ou idênticas, o número de seqüências depositadas nos bancos de dados, ou problemas na nomenclatura (JANDA & ABBOTT, 2007).

Em casos mais complicados, onde as sequências de espécies diferentes compartilham altas similaridade, resultados mais confiáveis tem sido obtidos quando o gene 16S rRNA é usado conjuntamente com outros genes. Além disso, a seleção de oligonucleotídeos iniciadores é de crucial consideração e irá depender da aplicação particular e se serão usados os genes rRNA de uma grande variedade de organismos ou grupos específicos (ROLING & HEAD, 2005).

Quanto a classificação através do sequenciamento, foram obtidas sequências de baixa qualidade, impossibilitando a identificação das espécies por esta técnica. É preciso levar em consideração que a amostra final de DNA do carrapato inteiro, extraído manualmente, contém: DNA proveniente do sangue do hospedeiro vertebrado, DNA da microbiota intestinal do carrapato, assim como microorganismos não inerentes ao carrapato. Quando a amostra possui o DNA para o qual os iniciadores foram desenhados a ligação específica e mais provável e uma única molécula é amplificada, produzindo sequências de boa qualidade pelo método Sanger, como observado para as amostras 7 e 512 que foram positivas para *E. canis* (Tabela 4). Porém, na ausência de DNA específico para os iniciadores desenhados, a reação é capaz de amplificar produtos inespecíficos a partir de diversas espécies o que impossibilita o sequenciamento dos produtos da PCR.

Das duas amostras de DNA extraído dos carrapatos, positivas para o agente de *E. canis* pela PCR e confirmadas pelo sequenciamento. A amostra 7 deste estudo, apresentou uma identidade de 100%, encontradas pelo Blast, com o isolado de *E. canis* obtido na Malásia (KR920044), e 99-100% de identidade com as sequências MF153942, MF153948, MF153951, MF153954, MF153963, MF153964, MF153944, MF153945, MF153946, MF153947, MF153955, MF153958, MF153956, MF153957, MF153959, MF153960, MF153961, MF153943, MF153949, MF153950, MF153952, MF153953 e MF153962, obtidas a partir de amostras do sangue dos cães avaliados nesse estudo. Já a amostra identificada como 512, também positiva para o agente de *E. canis* pela PCR e confirmada pelo sequenciamento, demonstrou uma similaridade de 99% com a amostra de *E. canis* da Malásia (KR920044) e uma identidade de 99% com as sequências supracitadas obtidas nesse estudo.

**Tabela 4.** Resultados da PCR e sequenciamento para agentes da Família Anaplasmataceae em carrapatos de cães.

Carrapato Nº	ECB-F ECB-R	ECAN-F HE3-R	Platys-F HE3-R	Sequenciamento
7	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. canis</i>
19	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
70	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
80	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
90	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
108	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
114	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
153	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
158	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
169	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
171	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
175	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
181	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
189	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
202	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
213	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
223	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
227	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
236	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
238	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
240	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
242	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
243	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
244	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
245	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
247	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
248	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
249	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
251	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
252	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
253	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
254	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
255	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
258	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
260	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
261	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
262	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
263	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
264	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou

---

265	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
267	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
268	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
296	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
312	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
324	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
328	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
338	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
345	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
358	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
363	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
365	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
368	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
374	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
375	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
380	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
388	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
407	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
411	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
413	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
415	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
418	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
419	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
426	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
427	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
428	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
430	Positivo	Negativo	Positivo	Não amplificou
436	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
449	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
487	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
493	Positivo	Positivo	Negativo	Não amplificou
497	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
500	Positivo	Negativo	Negativo	Não amplificou
512	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E.canis</i>
513	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
514	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
515	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
516	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou
517	Positivo	Positivo	Positivo	Não amplificou

---

### 5.3 ORDEM PIROPLASMIDA

Dos 216 cães avaliados na cidade de Piura, Peru, três (1,4%) foram positivos para *Babesia* sp. na PCR, utilizando-se os iniciadores PIRO A e PIRO B, com bandas visualizadas em aproximadamente 400 pb. Já nas amostras dos carrapatos, não houve amostras positivas na PCR, utilizando-se mesmos iniciadores.

As amostras positivas foram submetidas à digestão por enzimas de restrição (RFLP). Com a utilização da enzima *Hinf* I, não houve clivagem havendo apenas um fragmento visível de aproximadamente 407pb. Já com a enzima *Taq* I, todas as amostras foram clivadas em dois fragmentos visíveis, um de 175pb e 210pb como pode ser visto na Figura 14. O padrão de clivagem dessas amostras foi compatível com *B. vogeli* (CARRET et al., 1999).

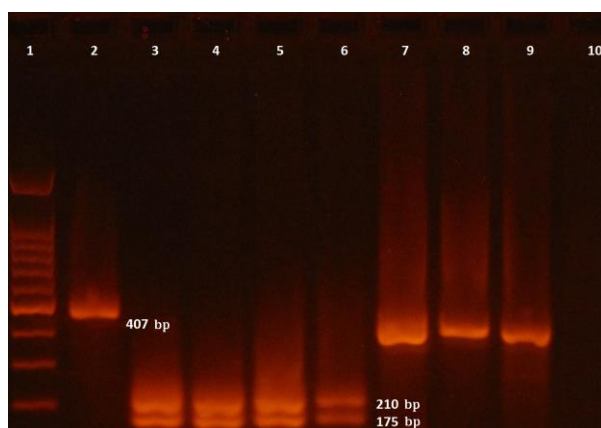


Figura 14. Eletroforese em gel agarose a 1,5% do resultado da digestão realizada por enzimas de restrição dos fragmentos amplificados dos 3 cães positivos na PCR, para piroplasmida. (1) Marcador de peso molecular, (2) Controle positivo para *B. vogeli* digerido pela *Hinf*I, (3) controle positivo de *B. vogeli* digerido por *Taq* I. (4-6) amostras dos 3 cães positivos digeridas com a enzima *Taq*I apresentando fragmentos em torno de 175 e 210pb. (7-9) amostras dos cães positivos digeridas com a enzima *Hinf*I apresentando o fragmento em torno de 407pb. Quando submetidos à enzima de restrição *Hinf* I, não houve clivagem (7-9) com um tamanho dos fragmentos amplificados de aproximadamente 407pb. (4-6) amostras positivas com padrão positivo para *B. vogeli*. A digestão realizada com enzima *Taq*I, amplificou e clivou fragmentos com aproximadamente 175pb e 210pb, (10) controle negativo, ≅ (Aproximadamente igual).

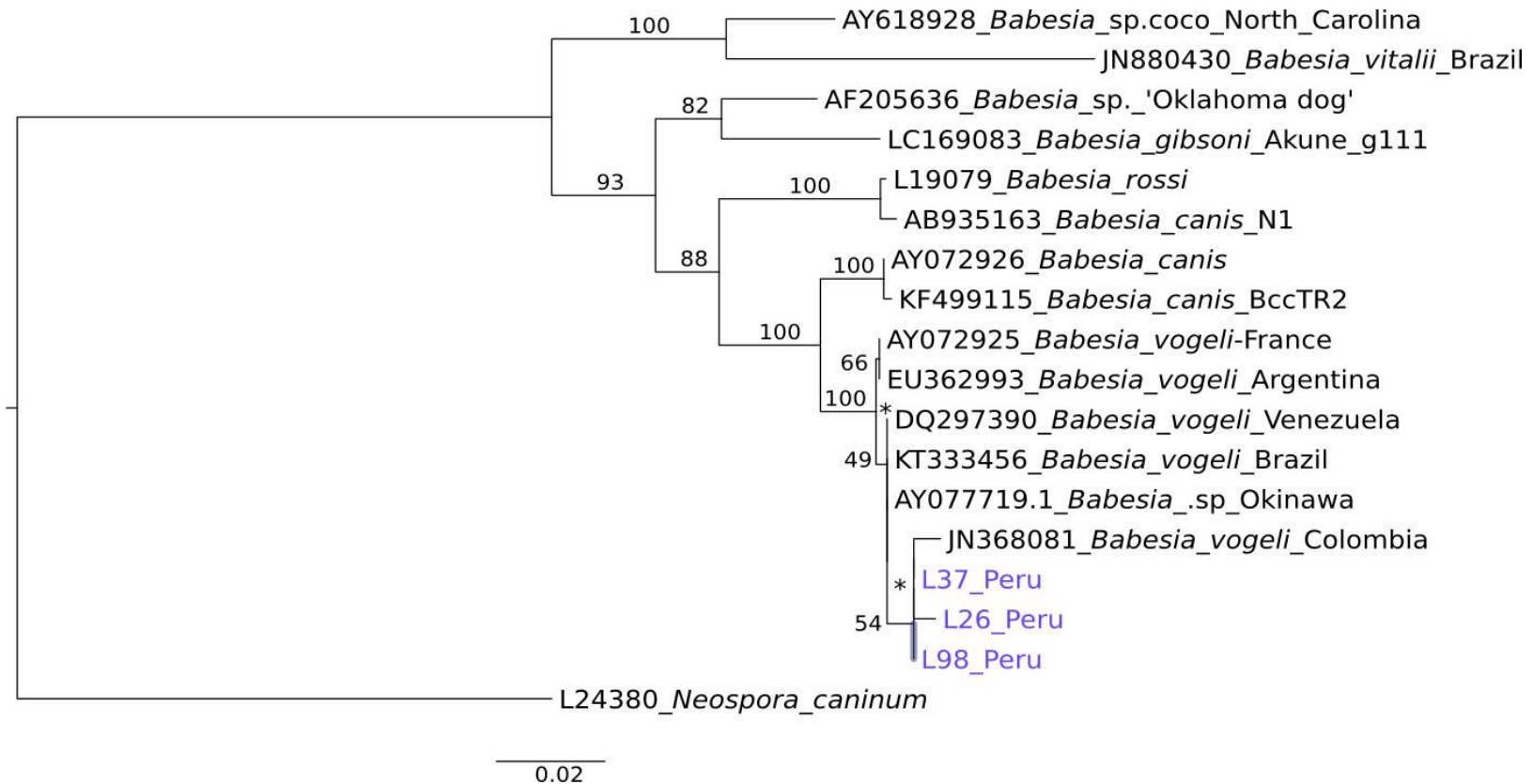
As sequências utilizadas na comparação da Ordem Piroplasmida foram: *Babesia canis rossi* (nº de acesso no “GenBank” L19079), *B. canis canis* (AY072926) dog-Croatia, *Babesia* sp. (AY077719) dog-Japan, *B. canis vogeli* (AY072925) dog-France, escolhidas por se agruparem no mesmo lado de *B. vogeli* na filogenia proposta por LACK et al. (2012), além

das sequências *B. gibsoni* (AF205636) dog-Oklahoma e *Babesia* sp. Coco (AY618928) dog-North Carolina, que serviram de comparação por serem outras espécies de piroplasmas. Além disso, foram utilizadas, na comparação, sequências relatadas em diferentes pontos da América do sul: *B. canis vogeli* (DQ297390) dog-Venezuela (CRIADO-FORNELIO et al., 2007), *B. canis vogeli* (EU362993) dog-Argentina (EIRAS et al., 2008), *B. canis vogeli* (KT333456) dog-Brazil (MORAES, et al., 2015), *B. canis vogeli* (JN368081) dog-Colombia (VARGAS-HERNANDÉZ et al., 2012). A sequência *Neospora caninum* (L24380) foi escolhida como outgroup por pertencer a um clado diferente ao das espécies de *Babesia* avaliadas. As sequências deste estudo foram depositadas no Genbank e receberam os seguintes códigos de acesso: BankIt1975452 L37\_Peru KY349101, BankIt1975452 L26\_Peru KY349102, BankIt1975452 L98\_Peru KY349103.

Comparadas com sequências de amostras positivas para *B. vogeli* de estudos realizados em outras regiões da América Latina, as amostras L26 Peru e L98 Peru demonstraram 99% de identidade com EU362993 *B. vogeli* Argentina (370 bp), JN368081 *B. vogeli* Colômbia (411 bp), KT333456 *B. vogeli* Brasil e DQ297390 *B. vogeli* Venezuela. Além disso, estas sequências evidenciaram 99% de identidade com sequências de amostras positivas para *B. vogeli* de estudos realizados em outros continentes: AY072925 *B. vogeli* France e AY0777191 *B. vogeli* Okinawa (Figura 15).

Quando comparadas com outras espécies de piroplasmas, as sequências L98 Peru, L26 Peru e L37 Peru possuíam 95, 95 e 93% de identidade, respectivamente, com AY072926 *B. canis* Croatia e KF499115 *B. canis* Turkey. Além disso, L98 Peru, L26 Peru e L37 Peru demonstraram um 89, 89 e 90% de identidade respectivamente, quando comparadas com *Babesia* sp. Coco isolada na Carolina do Norte, USA (AY618928).

PhyML ln(L)=-5238.3 1830 sites JC69 1000 replic. 4 rate classes



**Figura 15.** Dendograma filogenético baseado na seqüência parcial da porção 18S do gene rRNA de amostras positivas para *B. vogeli*, na região metropolitana da província de Piura-Peru, e seqüências similares obtidas através de acesso ao “Gen Bank”, mostrando os valores de “Bootstrap” obtidos após 1000 re-amostragens. A barra de escala representa a diferença (número de nucleotídeos) de cada *Babesia* dentro de cada ramo. As seqüências marcadas com (Peru) são amostras deste estudo, que foram positivos na PCR-RFLP para *Babesia vogeli* e confirmados através do sequenciamento.



Na América do Sul, estudos moleculares determinaram a presença de *B. vogeli*, *B. gibsoni* e *Rangelia vitalii* como agentes etiológicos da piroplasmose canina. Na Venezuela e na Colômbia, estudos em cães naturalmente infectados relataram prevalências de infecção por *Babesia* spp de 2,24% (3/134) e 5,4% (5/91), respectivamente (CRIADO-FORNELIO et al., 2007; VARGAS-HERNÁNDEZ et al., 2012), enquanto na Argentina, Eiras et al. (2008), relataram pela primeira vez *B. vogeli* nesse país, por PCR e análise filogenética. Eles amplificaram a região variável do gene RNA 18S de parasitas coletados de dois cães, e alinharam com as seqüências disponíveis no GenBank, no ramo de *B. vogeli*. No Brasil, Passos et al. (2005) relataram *B. vogeli* através de testes moleculares pela primeira vez no Brasil, sendo o primeiro relato no Rio de Janeiro descrito por Sá et al. (2006). Além disso, Lemos et al. (2012), reportaram 6,8% (7/103) de cães positivos para *Babesia* spp. amplificando também a região variável do gene RNA 18S.

Os três cães positivos para *B. vogeli*, no presente estudo, não apresentaram sinais clínicos compatíveis com a babesiose canina. Deve-se ressaltar que muitos cães portadores com infecções crônicas não apresentariam sinais clínicos a menos que seu sistema imunológico esteja comprometido (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Observações semelhantes foram relatadas em galgos adultos e pitbull terriers, que estavam clinicamente saudáveis apesar de serem soropositivos para *B. vogeli* e *B. gibsoni*, respectivamente (TABOADA et al., 1992; BIRKENHEUER et al., 2003; TABOADA E LOBETTI, 2006). Os patógenos se estabelecem e podem se reproduzir com maior intensidade os sinais clínicos quando o sistema imunológico está debilitado (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011). Em geral, infecções crônicas resultam da incapacidade do sistema imunológico do hospedeiro para eliminar a infecção.

Este é o primeiro relato de *B. vogeli* infectando cães no Peru, mediante o uso da PCR, RFLP e sequenciamento. *Babesia vogeli* foi a única espécie diagnosticada em todos os animais positivos em cães naturalmente infectados, em diferentes bairros de zonas urbanas na região metropolitana da província de Piura - Peru, no período de dezembro de 2014 a março de 2015. Entretanto, outros estudos, com maior número de animais, devem ser realizados para confirmar, ou não, se esta é a única espécie de piroplasma a parasitar cães daquele região.

#### 5.4 RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA

No presente estudo verificou-se, mediante PCR e sequenciamento, infecção no carrapato *R. sanguineus* (fêmea adulta) pela bactéria *Rickettsia felis*, com taxa de infecção em carrapatos de 0,2% (1/517). Essa amostra foi positiva na PCR que amplifica parte do gene *gltA*, porém, negativa para *ompA*, *ompB* e 17KD.

O hospedeiro vertebrado do carrapato foi um cão de 2 anos de idade do bairro de Tacalá no distrito de Castilla, negativo pela PCR para agentes da família Anaplasmataceae e agentes da ordem piroplasmida, e sem sinais clínicos suspeitos de alguma patologia.

Já na análise filogenética da sequência positiva para o gênero *Rickettsia*, as sequências utilizadas na comparação foram escolhidas por se agruparem no mesmo clado de *R. felis* na filogenia proposta por PEI-YI et al. (2007), além de outras sequências que serviram de comparação por serem outras espécies de rickettsias. A sequência *Rickettsia belii* (U59716) foi escolhida como outgroup por pertencer a um clado diferente a da espécie de *Rickettsia* avaliada. A sequência deste estudo foi depositada no Genbank e recebeu o seguinte código de acesso: KY887024.

A sequência da amostra positiva possuiu entre 97 e 98% de identidade comparada com sequências de *R. felis* isoladas em Taiwan (AF210692) e Espanha (AF540555) respectivamente. A análise filogenética mostrou que a sequência avaliada se agrupou no clado de *R. felis*, como pode ser observado na Figura 16. Entretanto o isolado deste estudo (KY887024), demonstrou uma identidade de 92 e 94% com isolados obtidos em Panamá (HM582437) e Peru (GU117906) respectivamente.

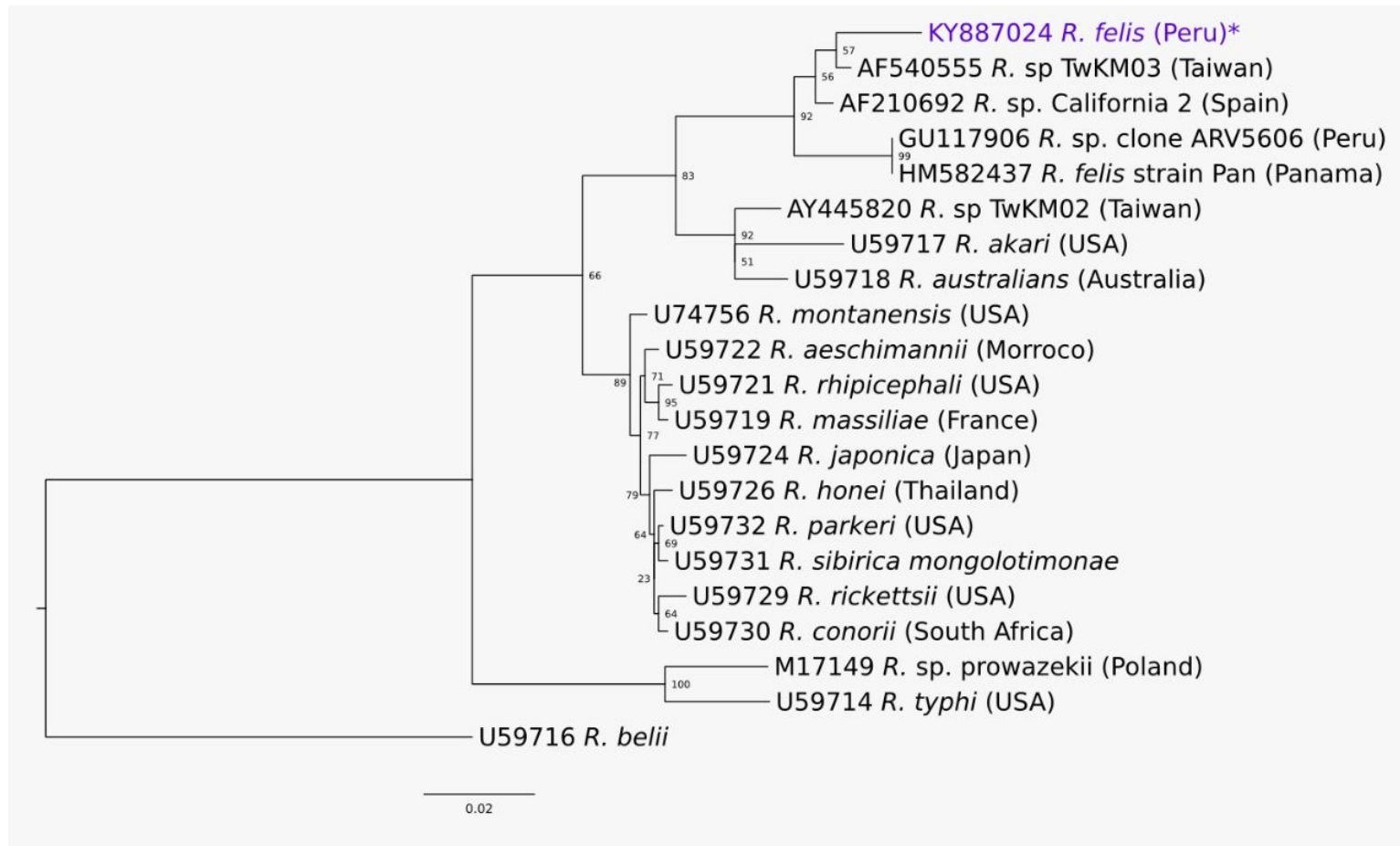
Quando comparadas a outras espécies de *Rickettsias*, as sequências deste estudo possuíram 93 e 94% de identidade com *R. rickettsii* (U59729) e *R. akari* (U59717) isoladas em EUA e 91% de identidade com *R. typhi* (U59714).

Diversas pesquisas em diferentes países, demonstraram que *R. felis* tem uma distribuição mundial (LABRUNA et al., 2011; ABARCA et al., 2013). *Rickettsia felis* foi identificado em pulgas (*Ctenocephalides* sp.), no México, Estados Unidos, Brasil, Peru, Etiópia, Espanha e Alemanha (SCHRIEFER et al., 1994; RAOULT et al., 2001; RICHTER et

al., 2002; MÁRQUEZ et al., 2002; ZAVALA et al., 2003; LABRUNA et al., 2011). Não obstante, também foi relatada em outras espécies de pulgas, mosquitos e carrapatos (CARDOSO et al., 2006, REIF; MACALUSO, 2009).

No presente estudo confirmou-se a presença de *R. felis* em *R. sanguineus* pela primeira vez no Peru. Em estudos anteriores (CARDOSO et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2008), *R. felis* foi detectada em *A. sculptum* (*A. cajennense sensu lato*) e *R. sanguineus* por nested PCR e PCR convencional direcionado para o gene rickettsial 17KD. Já Takinawa et al. (2013), conseguiram detectar *R. felis* em *R. sanguineus*, mediante PCR convencional e PCR em tempo real, utilizando o gene rickettsial *gltA*. Do mesmo modo que Cardoso et al. (2006), Oliveira et al. (2008) e Takinawa et al. (2013) não conseguiram amplificar outros fragmentos de gene de *R. felis* das suas amostras de carrapatos. No presente estudo também não conseguiu-se amplificar outros genes rickettsiais (i.e., *ompA*, *htrA*) mediante PCR convencional. A baixa carga rickettsial em *R. sanguineus* infectado por *R. felis* poderia explicar os resultados negativos pela PCR quando se utilizam outros protocolos de PCR que amplificam fragmentos maiores; portanto, menos sensíveis (BUSTIN, 2000).

O papel deste carrapato na ecologia e transmissão horizontal de *R. felis* ainda não foi esclarecido (REIF e MACALUSO, 2009). É provável que a fonte de infecção de *R. felis* para *R. sanguineus* seja o repasto de sangue em um hospedeiro parasitado por pulgas infectadas por *R. felis*. Entretanto, muitas espécies rickettsiais são capazes de crescer em grandes quantidades em linhagens celulares derivadas de carrapatos e outros artrópodes. Recentemente, a linhagem de células de carrapatos ISE6 foi utilizada para isolar *R. felis* anteriormente não cultivadas de pulgas de gato (PORNWIROON et al., 2006). Se futuros estudos confirmarem a capacidade de *R. sanguineus* para transmitir *R. felis*, os resultados do estudo atual embasaria a necessidade de controle de carrapatos e pulgas na prevenção da febre maculosa. Considerando que casos humanos de febre maculosa associada à espécie *R. felis* já foram relatados tanto no México como no Brasil (PÉREZ-OSORIO et al., 2008).



**Figura 16.** Dendograma filogenético baseado na seqüência parcial do gene *gltA* da amostra positiva para *R. felis*, na região metropolitana da província de Piura-Peru, e seqüências similares obtidas através de acesso ao “Gen Bank”, mostrando os valores de “Bootstrap” obtidos após 1000 re-amostragens. A barra de escala representa a diferença (número de nucleotídeos) de cada *Rickettsia* dentro de cada ramo. A seqüência marcada com (\*) é a amostra deste estudo, positiva na PCR para *Rickettsia spp* e confirmada através do sequenciamento como *R. felis*.

No Peru, Blair et al. (2004a) documentaram, mediante detecção molecular, a presença de agentes do GFM em três localidades em áreas rurais no noroeste do Peru (departamento de Piura), em 4 de 16 carrapatos das espécies *Amblyomma maculatum*, *Dermacentor (Anocentor) nitens*, *Ixodes boliviensis* e, em 2 de 59 "pools" de pulgas *C. felis*, durante um surto de febre no período de junho de 2002 e novembro de 2002 (BLAIR et al., 2004b), tanto de animais domésticos como animais de vida livre. No presente estudo, a taxa de infecção por agentes do gênero *Rickettsia* em carrapatos de cães da região Metropolitana da Província de Piura, no Departamento de Piura-Peru foi 0,2% (1/484).

As baixas prevalências de *Rickettsia* em estudos epidemiológicos, < 2%, mesmo em regiões consideradas como endêmicas (GUEDES et al., 2005; SANGIONI et al., 2005; PACHECO et al., 2009), pode ser explicada pela alta patogenicidade de algumas espécies de *Rickettsia* para o vetor, apresentando uma baixa taxa de sobrevivência (BURGDORFER e BRINTON, 1975; NIEBYLSKI et al., 1999; SOARES et al., 2012). Além disso, deve-se considerar a presença de hospedeiros vertebrados com um grau de bacteremia aceitável para infectar novos carrapatos suscetíveis (LABRUNA, 2009).

## 6. CONCLUSÕES

Analisando os resultados descritos e a discussão com outros trabalhos, pode-se concluir:

- A frequência de agentes da família Anaplasmataceae na população canina na Região Metropolitana da Província de Piura. Piura-Peru é de 18,5%, onde a maior foi no bairro de Tacalá, ocorrendo em infecções isoladas e associadas.
- Foi possível identificar, pela primeira vez na região estudada, através de evidência molecular, a presença de infecções isoladas e co-infecções causadas por agentes da família Anaplasmataceae.
- *Ehrlichia* sp., além de *E. canis* e *A. platys*, está presente em infecções de cães por membros da família Anaplasmataceae na população canina na Região estudada.
- *Babesia vogeli* foi a única espécie de piroplasma diagnosticada em todos os animais positivos em cães naturalmente infectados, na área estudada.
- Os cães podem ser importantes sentinelas para agentes rickettsiais, devendo-se, em pesquisas futuras, buscar por carrapatos em cães.
- Na fauna de ixodídeos encontrados, a presença de *R. sanguineus* foi maior comparada com as outras espécies encontradas, achados semelhante com dados de outros estudos em regiões urbanas.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; PERRET, C.; GUERRERO, J.; GODOY, P.; VELOZ, A.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; LEÓN, U.; GUTJAHR, C.; AZÓCAR, T. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p. 1392-1395, 2007.

ABOGE, G.O. et al. Molecular characterization of a novel 32-kDa merozoite antigen of *Babesia gibsoni* with a better diagnostic performance by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitology, Cambridge**, v.134, p.1185-1194, 2007.

ACCETTA, É. M. T. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) Trombocitopênicos da Região dos Lagos do Rio de Janeiro. (Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de veterinária Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2008.

ADASZEK, L., WINIARCZYK, S. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. **Vet Parasitol**, 152, 235–241, 2008.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999.

ADRIANZEN, J.; CHÁVEZ, A.; CASAS, E. C. 2003. Seroprevalencia de la Dirofilariosis y Ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. **Rev. Investig. Vet. Perú**, Vol.14, no.1, p.43-48, 2003.

AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (*Acari: Ixodidae*) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.

AGUIRRE, E., TESOURO, M.A., RUIZ, L., AMUSATEGUI, I., SAINZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine A** 53, 197–200, 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2006. *Essential Cell Biology*, 5a ed. London: Garland Science, 2006.

ALEKSEEV A, DUBININA H, SEMENOV A, BOLSHAKOV C. Evidence of Ehrlichiosis agents found in ticks (*Acari: Ixodidae*) collected from migratory birds. **Journal of Medical Entomology**, 38, 471–474, 2001.

ALMAZÁN, C., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V.H., FERNÁNDEZ DE MERA, I.G., CABEZAS-CRUZ, A., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R., DE LA FUENTE, J. Molecular

identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. **Ticks Tick Borne Dis.** 7, 276–283, 2016.

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. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: NDL.F. Livros, 2002.

ALVES, R.N., LEVENHAGEN, M.A., LEVENHAGEN, M.M., RIECK, S.E., LABRUNA, M.B., BELETTI, M.E. The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. **Veterinary Microbiology** 168, 442–446, 2014.

ANAYA E, MORÓN C, JARAMILLO K, MENDOZA L, ROMÁN R. Evidencia serológica de Ehrlichiosis humana en Ancash, Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**; 26(1), 54-57, 2009.

ANDERSON, B.E. et al. *Ehrlichia chaffeensis*, a New Species Associated with Human Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.12, p.2838-2842, 1991.

ANDERSON, B.E. et al. *Amblyoma americanum*: A Potencial Vector Of Human Ehrlichiosis. **American Journal of Medical Hygiene**, v.49, n.2, p.239-244, 1993.

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

ANO, H.; MAKIMURA, S.; HARASAWA, R. Detection of babesia species from infected dog blood by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 63, n. 1, p. 111-113, 2001.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-843, out. 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e Chave para os Representantes da Fauna Ixodológica Brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 59(2):115-130, 1961

ARAÚJO, A. C.; SILVEIRA, J. A.; AZEVEDO, S. S.;NIERI-BASTOS, F. A.;RIBEIRO, M. F.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n.5, p. 456-461, 2015.

ARRAGA-ALVARADO C, PALMAR M, PARRA O, SALAS P. Fine structural characterization of *Rickettsia*-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. **J Med Microbiol**, 48: 991-997, 1999.



ARRAGA-ALVARADO CM, QUROLLO BA, PARRA OC, BERRUETA MA, HEGARTY BC, BREITSCHWERDT EB. Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 91(6):1161-1165, 2014..

ASSARASAKORN, S.; NIWETPATHOMWAT, A. A complicated case of concurrent canine babesiosis and canine ehrlichiosis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 16, p. 281-284, 2007.

AYOOB, A.L., HACKNER, S.G, PRITTIE, J. Clinical management of canine babesiosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 20(1), 77-89, 2010.

AZAD, A.F.; WEBB, L.; CARL, M.; DASCH, G.A. Detection of Rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Annals New York Academy of Science**, v.590, p.557-563, 1990.

BAKER, D.C.; SIMPSON, H.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Veterinary Pathology** v.24 p.449-453. 1987.

BAKKEN, J.S. et al. Human Granulocytic Ehrlichiosis in The Upper Midwest United States. A New Species Emerging? **Journal of American Medical Association**, July 20, v.272, n.3, p.212-218, 1994.

BARNEWALL R, RIKIHISA Y. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. **Infection and Immunity**, 2, 4804–4810, 1994.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 223p. 2006.

BASTOS, C. V.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998–2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1026, n.1,p.158-160, 2004.

BEALL, M. J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M. D.; CYR, K. E.; DINIZ, P. P. V.P.; MAINVILLE, C.; HEGARTY, B. C.; CRAWFORD, J. M.; BREITSCHWERDT, E. B. Serological and Molecular Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* Species in Dogs from Minnesota, **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 4, 2008.

BEATI, L.; RAOULT, D. Mediterranean Spotted Fever and other Spotted Fever Group Rickettsiae. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. Zoonoses. Oxford: University Press, p. 217-240, 1998

BEATI, L.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A; MASON, P. R.; RAOULT, D. Prevalence of rickettsia-like organisms and spotted fever group rickettsiae in ticks (*Acari: Ixodidae*) from Zimbabwe. **Entomological Society of America**, v. 32, n. 6, p. 787-792, 1995.

BEAUFILS, J.P.; INOKUMA, H.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.; BARBAULTJUMELL, M.; BROUQUI, P. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. *Rev Med Vet*, v.153, p. 85-90, 2002.

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

BILLINGS, A. N.; YU, X. J.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a Spotted Fever Group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (*Acari: Ixodidae*) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 474-478, Jul. 1998.

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

BIRKENHEUER, A. J.; NEEL, J.; RUSLANDER, D.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Detection and molecular characterization of a novel large Babesia species in a dog. **Veterinary Parasitology**, v.124, n.3-4, p.151-160, 2004.

BIRKENHEUER, J., CORREA, T., LEVY, G., BREITSCHWERDT B. (2005). Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). **J Am Vet Med Assoc**, 227,942-947, 2005.

BIRKENHEUER AJ, HORNEY B, BAILEY M, SCOTT M, SHERBERT B, CATTO V, MARR HS, CAMACHO AT, BALLMAN AE: Babesia microti-like infections are prevalent in North American foxes. **Vet Parasitol**, 172:179-182, 2010

BLAIR PJ, JIANG J, SCHOELER GB, et al. Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae in Flea and Tick Specimens from Northern Peru. **Journal of Clinical Microbiology**. 2004;42(11):4961-4967, 2004.

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

BORIN S, CRIVELENTI LZ, FERREIRA FA. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. Naturalmente infectados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 61(3):566-571, 2009.

BOUNOUS, D. I.; HOSKINS, J. D.; BOUDREAUX, M. K. O Sistema Hematopoético. In: HOSKINS, J. D. *Pediatria Veterinária*. São Paulo: Manole, p.317-351, 1993.

BOURDOISEAU, G. Canine babesiosis in France. **Vet Parasitol**, 138, 118–125, 2006.

BOWMAN D. Arthropods. In: Bowman D, Lynn R, Eberhard M, Alcaraz A, editors. *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. Eight ed. St. Louis: Saunders; 2003. p. 48-59.

BRADFIELD, J.F.; VORE, S.J.; PRYOR JR, W.H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. **Laboratory Animal Science**. v. 46. n.05. p. 565-567, 1996.

BRANDÃO, L P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose Canina – **Revisão. Clin Vet**, v.41, p.50-59, 2002.

BRANDÃO, L.P., HAGIWARA, M.K, MYIASHIRO, S.I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Veterinary Parasitology**, 114(4), 253-265, 2003.

BRASIL. Portaria Nº. 1943/GM, de 18/10/2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Ministério da Saúde. Brasília: DOU, n. 204, seção 1, pág.35, de 24 de outubro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 7ed. Brasília: Ministério da Saúde, 816p, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa Interministerial nº 32, de 16 de agosto de 2013. "Estabelecer o regulamento sanitário para importação de materiais de origem animal e agentes de interesse veterinário destinados à pesquisa ou diagnóstico pelos laboratórios constitutivos da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), pela Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura (Renaqua) e por Instituições de pesquisa ou diagnóstico". Publicada no Diário Oficial da União de 19/08/2013, n. 159, seção 1, p. 5.

BRASIL, 2014. DATASUS/FEBRE MACULOSA - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SinanNet. Acessado dia 30/03/2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/fmaculosa/bases/febremaculosabrnet.def>

BRASIL, 2016. DATASUS/FEBRE MACULOSA - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SinanNet. [Acesso 21 jun 2016]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/febremaculoa.br.def>

BREITSCHWERDT, E.B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Ed.): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 5ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 2v., v.1, cap. 86, p.400-407.

BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular evidence supporting *Ehrlichia-canis* infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 642-649, 2002.

BREITSCHWERDT EB, WOODY BJ, ZERBE CA, et al. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. **J Vet Intern Med**, 1,2-9. 1987.

BREITSCHWERDT E, HEGARTY B, HANCOCK S. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella visonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, 36:2645-51, 1998.

BRKLJACIĆ, M., MATIJATKO, V., KIS, I., KUCER, N., FORSEK, J., RAFAJ B., et al. Molecular evidence of natural infection with *Babesia canis canis* in Croatia. **Acta Vet Hung**, 58(1),39-46, 2010.

BROOKS GF, BUTEL JS, MORSE SA. 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México: El Manual Moderno. 677 p.

BROWN, G.K.; MARTIN, A.R.; ROBERTS, T.K.; AITKEN, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Australian Vet. J.** 79 (8), 554-558, 2001

BROWN, G. K. ; CANFIELD, P. J.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K. ; MARTIN, A. R.; BROWN, C. S.; IRVING, R. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia **Australian Veterinary Journal** Volume 84, No 9, 321-325, 2006.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

BULLA, C, TAKAHIRA, R. K. ARAÚJO Jr., J. P., TRINCA, L. A., LOPES, R. S., WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, Paris, v. 35, n. 1, p. 141-146, jan-feb, 2004.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 19, p. 1010-1014, 1970.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 61-72, Nov. 1975.

BUSTAMANTE ME, VARELA G. Distribution of rickettsioses in Mexico. **Rev Inst Salubr Enferm Trop**; 8, 3-14, 1947.

CACCIO, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. R.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N.J. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Veterinary Parasitology**, 106, p. 285-292, 2002.

CAMACHO, T., PALLAS, E., GESTAL, J., GUITIÀN, J., OLMEDA, S., GOETHERT, K. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **Vet Rec**, 149,552-555, 2001.

CAMACHO A, GUITAN E, PALLAS E, et al. Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like infected dogs. **J Vet Intern Med** 2004; 18(2):141-146.

CAMACHO-GARCIA, T. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. **Vet Parasitol**, 138,97-102, 2006.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S. L. Manual de vigilância acarológica. São Paulo: Secretaria

Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo, p. 35-37, 2004.

CAO W, GAO Y, ZHANG P, ZHANG X, DAI Q, DUMLER J, FANG L, YANG H. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from southern China. **Journal of Clinical Microbiology**, 38, 2778–2780, 2000.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CARDOSO, L.; COSTA, Á.; TUNA, J.; VIEIRA, L.; EYAL, O.; YISASCHAR MEKUZAS, Y.; BANETH, G. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.156, n.3, p.199-204, 2008.

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

CARDOZO, G. P.; OLIVEIRA, L. P.; VISSOU, V.G.; DONINI, I. A. N., ROBERTO, P.G.; MARINS, M. Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil, Braz. **J. Microbiol.** 38:478-479, 2007.

CARLI, S. TASCIA, M. TROTTA, T. FURLANELLO, M. CALDIN, L. SOLANO-GALLEGO, Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection, **Veterinary Parasitology**, Volume 162, Issues 1–2, Pages 51-57, 2009.

CARPENTER CF, GANDHI TK, KONG IK, COREY GR, CHEN SM, WALKER DH, DUMLER JS, BREITSCHWERDT E, HEGARTY B, SEXTON DJ. The incidence of ehrlichial and rickettsial infection in patients with unexplained fever and recent history of tick bite in central North Carolina. **J. Infect. Dis.** 180:900-903, 1999.

CARTER G. Bacteriología y Micología Veterinarias.México. El Manual Moderno 1985; 280-287.

CARVALHO, F. S. et al. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.

CARVALHO, L., ARMUA-FERNANDEZ, M. T., SOSA, N., FÉLIX, M. L., VENZAL, J. M. *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 8(2), 241-245, 2017.

CASSINI, R., ZANUTTO, S., FRANGIPANE, A., GABRIELLI, S., CALDERINI, P., MORETTI, A; et al. Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. **Vet Parasitol**, 165,30-35, 2009.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; TINUCCICOSTA, M. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. 2011. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. Disponível em : <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/> and <http://www.cdc.gov/ehrlichiosis/>.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States; a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. CDC, Atlanta, GA. v.55, n.RR-4, 36p, 2006.

CHAPMAN AS, MURPHY SM, DEMMA LJ, et al. Rocky mountain spotted fever in the United States, 1997–2002. **Ann N Y Acad Sci**, 1078:154–5, 2006.

CHAVERA, A.; VIERA, F. Y SAMAMÉ, H. 1982. Ehrlichiosis Canina en el Perú. Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Ica – Perú.

CHEN S, DUMLER J, BAKKEN, J, WALKER D. Identification of a Granulocytotropic *Ehrlichia* Species as the Etiologic Agent of Human Disease. **Journal of Clinical Microbiology** 1994; 32(3) 589-595.

CHEN LF, SEXTON DJ. What's New in Rocky Mountain Spotted Fever. **Infect Dis Clin N Am**, 22: 413-432, 2008.

CHENG Y, LIU Y, WU B, ZHANG JZ, GU J, LIAO YL, et al. Proteomic analysis of the *Ehrlichia chaffeensis* phagosome in cultured DH82 cells. **PloS One**, 9: e88461, 2014

CHILDS J, SUMNER J, NICHOLSON W, MASSUNG R, STANDAERT S, PADDOCK C. Outcome of diagnostic tests using samples from patients with culture-proven human monocytic ehrlichiosis: implications for surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, 37:2997–3000, 1999.

CICUTTIN GL, BRAMBATI DF, RODRÍGUEZ EUGUI JI, LEBRERO CG, DE SALVO MN, ANDA P, et al. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). **Ticks Tick Borne Dis**. 5: 484–488, 2014.

CICUTTIN G.L, E.L. TARRAGONA, M.N. DE SALVO, A.J. MANGOLD, S. NAVA. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks Tick Borne Dis.**, 6, pp. 724–729, 2015.

COOPER, G. M. A célula, uma abordagem molecular. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, 712 p.

CORTÉS-VECINO JA. Bioecología, Distribución y Comportamiento de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:Ixodidae)* en el Altiplano Cundiboyacense, Colombia. [Ph.D. Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.341 p.

COSTA, H.X. Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia. 2011. 58 f. Dissertação (Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

COSTA-JÚNIOR, L.M. et al. 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, Londres**, v.86, p.257–260, 2009.

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

CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBA-CARRETERO, C. Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in Southern Europe Part I: Epizootiological aspects. **Vet Parasitol**, 113,189-201, 2003.

CRIADO-FORNELIO A, MARTINEZ-MARCOS A, BULING-SARAÑA A, BARBA-CARRETERO JC: Presence of Mycoplasma haemofelis, Mycoplasma haemominutum and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Vet Microbiol** 2003a, 93:307-317.

CRIADO-FORNELIO, A.; REY-VALEIRON, C.; BULING, A.; BARBA-CARRETERO, J.C.; JEFFERIES, R.; IRWIN, P. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 261–269, 2007.

CUNHA, N.C. Estudo Epidemiológico de Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em caninos, equinos e seus carrapatos no município de Resende, estado do Rio de Janeiro, Brasil. 2009. 89p. Tese (doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, v. 22, p.191-201, 2001.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S. et al. 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.

DANIEL, W. 1996. Bioestadística base para análisis de las ciencias de la Salud 5ta edición. p 205-206. Editorial Limusa. México.

DANTAS-TORRES F. Rocky Mountain spotted fever, **The Lancet Infectious Disease**. Nov 2007; 7 (11): 724-732.

DANTAS-TORRES F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet Parasitol**. 15, 152(3-4), 173-85, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, Keele University, v. 3, n. 1, p. 26-37, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Vet Parasitol**, v.141, p.197-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 151–154, 2004

DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L.A., BRANDAO-FILHO, S.P., 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 39, 64–67, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 1-17, 2013.

DANTAS-TORRES F, MAIA C, LATROFA MS, ANNOSCIA G, CARDOSO L, OTRANTO D. Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus (sensu lato)* ticks from dogs in Portugal. **Parasites & Vectors**. 10:133, 2017.

DASH, G. A.; EREMEEVA, M. E. Laboratory diagnosis of rocky mountain spotted fever and other rickettsioses in the Americas: contemporary approaches and prospects for future improvements. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETTSIOSE, 14., 2006, Ribeirão Preto-SP. Anais... Ribeirão Preto: 2006.

DAVOUST, B. – Canine ehrlichiosis, **Point Vét.**, 25 (151): 43-51, 1993.

DAWSON JE, ANDERSON BE, FISHBEIN DB, SA'NCHEZ JL, GOLDSMITH CS, WILSON KH, DUNTLEY CW. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. From a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **J Clin Microbiol** 29: 2741-2745, 1991.

DAWSON J, CANDAL F, GEORGE V, ADES E. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. *Pathobiology* 1991b; 61:293–296.

DAWSON, J.E., STALLKNECHT, D.E., HOWERTH, E.W., WARNER, C., BIGGIE, K., DAVIDSON, W.R., LOCKHART, J.M., NETTLES, V.F., OLSOM, J.G., CHILDS, J.E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol**. 32, 2725-2728, 1994.



DAWSON, J.E., BIGGIE, K.L., WARNER, C.K., COOKSON, K., JENKINS, S., LEVINE, J.F., OLSON, J.G. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human disease, in dogs from southeast Virginia. **Am. J. Vet. Res.** 57,1175-1179, 1996.

DE PADUA M. Avaliação hematológica de sangue e medula óssea e bioquímica sérica de cães infectados naturalmente por hemoparasitas. Dissertação (Mestrado) em Medicina e Cirurgia Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

DE PAULA, D. A. J., DAHROUG, M. A. A., DE FREITAS, A. G., DA SILVA, J. N., DUTRA, V., NAKAZATO, L., & SOUSA, V. R. F. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks of dogs in Cuiaba, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, 33(3), 1123-1126, 2012.

DE TOMMASI AS, BANETH G, BREITSCHWERDT EB, et al. *Anaplasma platys* in Bone Marrow Megakaryocytes of Young Dogs. Loeffelholz MJ, ed. **Journal of Clinical Microbiology**. 52(6), 2231-2234, 2014.

DELL' PORTO, A., OLIVEIRA, M.R., MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 2, 37–40, 1993.

DEMMA LJ, TRAEGER MS, NICHOLSON WL, PADDOCK CD, BLAU DM, EREMEEVA ME, DASCH GA, LEVIN ML, SINGLETON J JR, ZAKI SR, CHEEK JE, SWERDLOW DL, MCQUISTON JH. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **N Engl J Med**, 11, 353(6), 587-94, 2005.

DEZDEK D, VOJTA L, CURKOVIĆ S, LIPEJ Z, MIHALJEVIĆ Z, CVETNIĆ Z, BECK R: Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. **Vet Parasitol**, 172, 333-336, 2010.

DIAS, E. O cão como provável reservatório do vírus da febre maculosa brasileira. **Revista Brasil-Médico, Rio de Janeiro**, n. 51, p. 1245-1247, 1937.

DÍAZ, I. A. C. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella), Estado actual en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**; v. 17, n. 2, p.119-124, 2001.

DINIZ, P. P. V. P. et al. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 689-697, 2007.

DOYLE CK, NETHERY KA, POPOV VL, MCBRIDE JW. 2006. Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. **Infect. Immun.** 74:711–20, 2006.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Taxonomic position of the Rickettsiae: current knowledge. **FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam; Elsevier**, v. 13, n. 1, p. 13-24, Jan. 1994.

DUARTE, S. C.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A.; LINHARES, G. F. C. Phylogenetic characterization of *Babesia canis vogeli* in dogs in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 274-280, 2011.

DUGAN V, LITTLE S, STALLKNECHT D, BEALL A. Natural infection of domestic goats with *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 38:448–449, 2000.

DUH, D., TOZON, N., PETROVEC, M., STRASEK, K., AVSIC-ZUPANC, T., et al. Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. **Vet Res**, 35, 363–368, 2004.

DUMLER J; BARBET. A; BEKKER. C; DASCH. G; PALMER. G; RAY. S; RIKIHISA. Y; RURANGIRWA. F. Reorganization of genera in the familia 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* an HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 2145-2165, 2001.

DUNN BE, MONSON TP, DUMLER JS, MORRIS CC, WESTBROOK AB, DUNCAN JL, DAWSON JE, SIMS KG, ANDERSON BE. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. **J. Clin. Microbiol.** 30:2207–2210, 1992.

DUNNING HOTOPP, J. C., LIN, M., MADUPU, R., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S. V., EISEN, J., ... TETTELIN, H. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. **PLoS Genetics**, 2(2), e21, 2006.

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

EIRAS, D. F.; BASABE, J.; MESPLET, M.; SCHNITTGER, L. First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.157, p. 294-298, 2008.

EIRAS D F, CRAVIOTTO M B, VEZZANI D, EYAL O, BANETH G. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 36: 169-73, 2013.

EIRAS, D. F.; CRAVIOTTO, M. B.; BANETH, G.; MORÉ, G. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. **Parasitology International**, v. 63, n. 5, p. 729 – 734, 2014.

ELISBERG BL, BOZEMAN FM. The Rickettsiae. In: Diagnostic Procedures, 5th edition, Lenne- He EH. American Public Health Association, 1979: 1061-1109.

ESTARES, P.; CHÁVEZ V.; CASAS A. Ectoparasitos en caninos de los distritos de la zona climática norte de lima metropolitana. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v. 11, n. 1, p. 72-76, abr. 2014.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Rickettsiae . In: LEDERBERG, J. Encyclopedia of Microbiology, New York. v. 4, 2a. ed. Academic Press. p. 140-180, 2000.

EREMEEVA, M.E.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group Rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**. v.32; n.3; p.803-810, 1994

EREMEEVA, M.E.; MADAN, A.; SHAW, C.D.; TANG, K.; DASCH, G.A. New perspectives on rickettsial evolution from new genome sequences of rickettsia, particularly *R. canadensis*, and *Orientia tsutsugamushi*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1063:47–63, 2005

EREMEEVA ME, ZAMBRANO ML, ANAYA L, BEATI L, KARPATY SE, SANTOS-SILVA MM, SALCEDA B, MACBETH D, OLGUIN H, DASCH GA, ARANDA CA. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. **J Med Entomol**. 2011 Mar;48(2):418-21.

ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. The distribution and ecological 'preferences' of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 283-292, Apr. 2004.

ESTRADA, D.A.; SCHUMAKER, T.T.S.; SOUZA, C.E.; NETO, E.J.R.; LINHARES, A.X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.68-71, 2006.

EVANS DE. *Boophilus microplus* ecological studies and tick fauna synopsis related to the developing cattle industry in the Latin American and Caribbean region [Ph.D. Tesis]. North East London Polytechnic.; United Kingdom. 1978. 283

EVERETT E, EVANS K, HENRY R, MCDONALD G. Human Ehrlichiosis in adults after tick exposure: Diagnosis using polymerase chain reaction. **Annals of Internal Medicine**, 120:730–735, 1994.

EWING, S.A.; BUCKNER, R.G. Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in dog. **American journal of Veterinary Research**. v. 26 n. 113 p.815-828, 1965.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2005.

FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 112. p. 785-807, 2004.

FERREIRA, M. F. (2008). Parasitoses Caninas Transmitidas por Ixodídeos. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M.; GUIMARÃES, C. M.; SÁ, A. G.; ABREU, F. S.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **Int J Appl Res Vet Med** 5: 113-119, 2007.

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO P. B.; AZEVEDO, R. R. M.; RODRIGUES, I. L.F.; ALMOSNY, N. R. P. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães pcr-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, 2008

FISHBEIN, D.B.; DAWSON, J.E.; ROBINSON, L.E. Human Ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. **Annals of Internal Medicine** , v.120, n.09, p.736-743, 1994.

FLORES-MENDOZA C, FLORIN D, FELICES V, et al. Detection of Rickettsia parkerifrom within Piura, Peru, and the First Reported Presence of Candidatus Rickettsia deanae in the Tick Rhipicephalus sanguineus. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, 13(7):505-508, 2013.

FÖLDVÁRI, G., HELL, E., FARKAS, R., et al. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Vet Parasitol**, 127,221–226, 2005.

FOURNIER PE, RAOULT D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of Rickettsia spp. **Ann N Y Acad Sci**, 1166: 1-11, 2009.

FORSHEY BM, STEWART A, MORRISON AC, GALVEZ H, ROCHA C, ASTETE H, et al. Epidemiology of spotted fever group and typhus group rickettsial infection in the Amazon Basin of Peru. **Am J Trop Med Hyg**, 82(4): 683-690, 2010.

FRANK J, BREITSCHWERDT E. A retrospective study of Ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 13:194–201, 1999.

FRITZ, D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). **Parasitology Research**, v. 106, n. 6, p. 1339-1342, 2010.

FRUTOS R, et al. Comparative genomic analysis of three strains of Ehrlichia ruminantium reveals an active process of genome size plasticity. **J Bacteriol**, 188:2533–2542, 2006.

FUENTES LG. First case of Rocky Mountain spotted fever in Costa Rica, Central America. **Rev Latinoam Microbiol**, 21: 167–72, 1979.

FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SHIGENO, S.; KIMBITA, E.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing Babesia gibsoni infection in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 63, n.9, p. 977-981, 2001.

FUKUMOTO, S., SUZUKI, H., IGARASHI, I., XUAN, X. Fatal experimental transplacental Babesia gibsoni infections in dogs. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1031-5, 2005.

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M. et al. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Vet Parasitol**, v.134, p.77–85, 2005.

GALVÃO, M. A. M.; WALKER, D. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; NEVES, C. V. B.; MAFRA, C. L.; FREITAS, R. N.; CARDOSO, L. D. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 22, n. 3, p. 495-501, mar. 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. **Taxonomic outline of the prokaryotes**. Berg's Manual of systematic bacteriology. 2. ed., 2004. 401p.

GASPARNI, M.R. ; COELHO, A. L. M. ; JOJIMA, F. S. ; VIDOTTO, M. C. ; VIDOTTO, O. Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. In: Program & Resumos do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul, 2008, Curitiba. XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Curitiba, 2008. v. 15.

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

GE Y, RIKIHISA Y. Surface-exposed proteins of *Ehrlichia chaffeensis*. **Infect. Immun.** 75:3833–41, 2007.

GIMÉNEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1964.

GITHEKO AK, LINDSAY SW, CONFALONIERI UE, PATZ JA. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. **Bull World Health Organization** 78:1136-1147, 2000.

GLENNY A, MARTHA, MENDOZA U, LEONARDO Y FALCONI R, EDUARDO. Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* e identificación de garrapatas ixodidas en Piura Y Amazonas, Perú. **Rev Peru MedExp Salud Publica**, ene./mar, vol.20, no.1, p.23-27, 2004.

GODDARD J, VARELA-STOKES A. Role of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), in human and animal diseases. **Veterinary Parasitology**, 160:1-12, 2008.

GREENE R. Ehrlichiosis canina: Implicaciones clínicas de factores humorales 317-320. In Kirk (ed.), Terapéutica Veterinaria de Pequeños animales. 1997; 12va ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

GREGORY, C.; FORRESTER, S. O. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, *E. risticii* infections. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 404-414.

GUEDES E, LEITE RC, PRATA MC, PACHECO RC, WALKER DH, LABRUNA MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100: 841–45, 2005.

GUGLIELMONE AA, ESTRADA-PEÑA A, KEIRANS JE, ROBBINS RG. Ticks (*Acari: Ixodidae*) of the neotropical zoogeographic region. The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick – borne Diseases (ICTTD – 2).2003. 173 p.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PENA, A.; MANGOLD, A.J.; BARROSBATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; MARTINS, J.R.; VENZAL, J.M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J.E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (*Acari: Ixodidae*): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Vet. Parasitol.**, v.133, n.3/4, p.273-288, 2003.

GUGLIELMONE AA, BECHARA GH, SZABÓ MP, BARROS DM, FACCINI JL, LABRUNA M, DE LA VEGA R, ARZUA M, CAMPOS M, FURLONG J, MANGOLD AJ, MARTINS J, RODRÍGUEZ M, VENZAL JM, ESTRADA A. Garrapatas de importancia médica y veterinaria: América Latina y El Caribe. The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick – borne Diseases (ICTTD – 2).2004. 44 p.

GUIMARÃES, A.M., OLIVEIRA, T.M.F.S., SANTA-ROSA, I.C.A.. Babesiose canina: uma visao dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clin. Vet.** 41, 60–68. 2002

GUIMARÃES, J. C.; ALBERNAZ, A. P.; MACHADO, J. A.; JUNIOR, O. A. M.; GARCIA, L. N. N.; Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 229, 2004.

GÜNTHER G, HAGLUND M. Tick-borne encephalopathies: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. **CNS Drugs**, 19 (12):1009-32, 2005.

GRUSBY, M. J.; JOHNSON, R. S.; PAPAIOANNOU, V. E.; GLIMCHER, L. H. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. **Science**, v. 253, n. 5026, p. 1417-20, 1991.

HAMEL, L., SILAGHI, C., LESCAI, D., PFISTER, K. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. **Parasitol Res**, 110(4), 1537-45, 2012.

HAND, M.; C. THATCHER.; R. REMILLARD.; P. ROUDEBUSH. 2000 Nutrición Clínica de los Pequeños Animales. p. 1341, 4º ed., Mark Morris, Colombia.

HARKESS JR, STUCKY D, EWING SA. Neurologic abnormalities in a patient with human Ehrlichiosis. **South. Med. J.** 83:1341–1343, 1990.

HARRUS S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*), **The Veterinary Journal**, Volume 204, Issue 3, p. 239-240, 2015.

HARRUS, S.; WANER, T.; Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal** 187(3):292-6, 2011

HARRUS, S., T. WANER, D. J. WEISS, A. KEYSARY. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 51:13-20, 1996.

HARRUS, S., T. WANER, Y. AVIDAR, E. BOGIN, P. HUO-CHENG. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**. 66:241- 249, 1996b.

HARRUS, S., I. AROCH, E. LEVY, H. BARK. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet. Rec.** 141:247-250, 1997.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, [S.l.]: v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997a.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic function in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary immunology and immunopathology**. Amsterdam, v.62, n.1, p.15-27, 1998.

HARRUS S, WANER T, BARK H, JONGEJAN F, CORNELISSEN WCA. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology** 71:2516-252, 1999.

HARRUS, S., DAY, M.J., WANER, T., BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology** 83, 343–349, 2001.

HARRUS, S.; ALLEMAN, R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**. v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

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

HARRUS S, PERLMAN-AVRAHAMI A, MUMCUOGLU KY, MORICK D, EYAL O, BANETH G: Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovi*, *Anaplasma platy*, *Candidatus Midichloria mitochondri* and *Babesia canis vogel* in ticks from Israel. **Clin Microbiol Infect**. 17: 459-463, 2011.

HARVEY, J.W. *Ehrlichia platys* infection (Infectious Cyclic Thrombocytopenia of Dogs) In. GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, WB Saunders Company, 1990. cap.37 p.415-418, 1990.

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.

HAYES SF, BURGDORFER W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in Dermacentor andersoni ticks: an ultrastructural analysis. **Infect Immun**, 37(2):779–85, 1982.

HEADLEY SA, SCORPIO DG, BARAT NC, VIDOTTO O, DUMLER JS. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Emerg Infect Dis** 12: 1303-1304, 2006.

HECHEMY, K. E.; OTEO, J. A.; RAOULT, D.; SILVERMAN, D. J.; BLANCO, J. R.; New insights into Rickettsioses: genomics, proteomics, pathobiology, and the international threat of Rickettsial diseases. Introduction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1063: xiii-xx, 2005.

HIDALGO L, OREJUELA M, FUYA P, CARRILLO P, HERNÁNDEZ J, PARRA E, et al. Rocky Mountain Spotted Fever, Colombia. **Emerg Infect Dis**. 13(7): 1058- 1060, 2007.

HIDALGO M, VESGA JF, LIZARAZO D, VALBUENA G. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and Ehrlichia chafeensis in domestic animals from a rural area of Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 80(6):1029-1030, 2009.

HILDEBRANDT, P. K.; CONROY, J. D.; MCKEE, A. E.; NYNDO, M. B. A.; HUXSOLL, D. L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity, Washington**, v. 7, n. 2, 265-71, 1973.

HINRICHSSEN, V.L., WHITWORTH, U.G., BREITSCHWERDT, E.B., HEGARTY, B.C. & MATHER, T.N. "Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs", **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 218, no. 7, pp. 1092-1097, 2001.

HOLLAND C J, WEISS E, BURGDORFER W, COLE A I, KAKOMA I. *Ehrlichia risticii* sp. nov.: etiological agent of equine monocytic ehrlichiosis (synonym, Potomac horse fever) **Int J Syst Bacteriol**. 35:524–526, 1985.

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

HOMER, M.J., AGUILAR-DELFIN, I., TELFORD 3RD, S.R., KRAUSE, P.J., PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin. Microbiol. Rev.** 13, 451–469, 2000.

HORAK IG, CAMICAS JL, KEIRANS JE. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Exp Appl Acarol**, 28(1-4):27-54, 2002.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted Fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: Diagnosis and treatment. **Canine Practice**. v.16 n.3 p.13-21.1991a.



HOSKINS, J.D. (b) Tick-borne Zoonoses: Lyme disease, Ehrlichiosis and Rock Mountain Spotted Fever. **Small Animal** v. 3(3):236-243, 1991b.

HOYOS S., L., LI E., O., ALVARADO S., A., SUÁREZ A., F., DÍAZ C., D. Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. **Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú**, 18(2), 129-135, 2012.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J. et al. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.211- 216, 2005.

HUGH-JONES M. The remote recognition of ticks habitats. **Journal of Agriculture Entomology**. 8(4):309-15, 1991.

HUGH-JONES M, BARRE N, NELSON G, WEHNES K, WARNER J, GARVIN J, & GARRIS G. LANDSAT-TM. identification of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) Habitats in Guadeloupe. **Remote Sensing of Environment**. 40(1):43-55, 1992.

HUNFELD KP, A. HILDEBRANDT, J.S. GRAY, Babesiosis: Recent insights into an ancient disease, **International Journal for Parasitology**, Volume 38, Issue 11, 1219-1237, 2008.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; FERGUSON, J.A. & WALKER, J. S. Ehrlichia canis. The causative agent of a hemorrhagic disease of dogs? **Veterinary Record**, v.85:587, 1969.

INOKUMA H, RAOULT D, BROUQUI P: Detection of Ehrlichia platy DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J Clin Microbiol** , 38:4219-4221, 2000.

INOKUMA, H., K. KUJII, K. MATSUMOTO, M. OKUDA, K. NAKAGOME, R. KOSUGI, M. HIRAKAWA. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Vet. Parasitol.** 110:145-152, 2002.

INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**. v. 115 p. 343-348, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA (INEI). Banco de dados estatísticos Censo 2007. Disponível em: <<http://www.inei.gov.pe/biblioineipub/bancopub/Est/LIb0002/indibasi.htm>> Acesso em 15 de julho 2015.

IORI A, GABRIELLI S, CALDERINI P, MORETTI A, PIETROBELLI M, TAMPIERI MP, GALUPPI R, CANCRINI G: Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. **Vet Parasitol**, 170:291-296, 2010.

IRWIN, P. (2005) Canine Babesiosis. In M.J. Day & S.E. Shaw (Eds.), Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. (pp. 63-77). London: Manson Publishing.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites and Vectors**, v.2 (Suppl I), p.S4, 2009

IRWIN, P. J. Canine Babesiosis, **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Volume 40, Issue 6, 1141-1156, 2010.

IRWIN, P.J, HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. **Australian Veterinary Journal**, 68(6), 204-209, 1991.

ISMAIL N, BLOCH KC, MCBRIDE JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. **Clin Lab Med** 30: 261 e92, 2010.

JACKSON RT, JACKSON JW. Ehrlichiosis with systemic sepsis syndrome. **Tenn. Med.** 90:185–186, 1997.

JACOBS RF, SCHUTZE GE. 1997. Ehrlichiosis in children. **J. Pediatr.** 131:184–192, 1997

JACOBSON, L. S. AND LOBETTI, R. G. Rhabdomyolysis as a complication of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, 37: 286–291, 1996.

JACOBSON, L. S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. **Vet Parasitol**, v.138, p.126-139, 2006.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; MUHLNICKEL, C. J.; IRWIN, P. J. Two species of canine Babesia in Australia: detection and characterization by PCR. **Journal of Parasitology**, v.89, n.2, p. 409-412, 2003.

JEFFERIES R, RYAN UM, JARDINE J, et al. Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of Babesia gibsoni in dogs. **Aust Vet J** 85: 459–63, 2007.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3-4, 2004.

KETTNER F, REYERS F, MILLER D. Thrombocytopaenia in canine babesiosis and its clinical usefulness. **J S Afr Vet Assoc**, 74:63–8, 2003.

KIRTZ, G., LESCHNIK, M., HOOIJBERG, E., TICHYS, A., LEIDINGER, E. (2012). In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**, 24,40(2),87-94, 2012.

KJEMTRUP, A.M, CONRAD, P.A. A review of the small canine piroplams from California: Babesia conradae in the literature. **Veterinary Parasitology**, 138(1-2),112-117, 2006.

KLOMPEN JSH, BLACK WC, KEIRANS JE, NORRIS DE. Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. **Cladistics**.16(1):79-102, 2000.

KOCAN A, LEVESQUE G, WHITWORTH L, MURPHY G, EWING S, BARKER R. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. **Emerging Infectious Disease**, 6:477–480, 2000.

KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGERTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R.; McPHERSON, J.E.; McCORMACK, J.N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n.8 p.2631-2638, 1999.

KRAMER V, RANDOLPH M, HUI L, IRWIN W, GUTIERREZ A, VUGIA D. Detection of the agents of human Ehrlichioses in ixodid ticks from California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 60:62–65, 1999.

KUMAR, A.; VARSHNEY, J. P.; PATRA, R. C. A comparative study on oxidative stress in dogs infected with *Ehrlichia canis* with or without concurrent infection with *Babesia gibsoni*. **Vet Res Commun** 30:917–920, 2006.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M.B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACARALOGIA, 1, 2006, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 63-78.

LABRUNA, M.B. Ecology of Rickettsia in South America. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1166,156–166, 2009.

LABRUNA, M.B., PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clin. Vet.** 30, 24-32, 2001.

LABRUNA, M.B.; WHIWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.90-98, 2004.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JACOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 36, p. 149-163, 2005.

LABRUNA, M.B.; SOARES, J.F.; MARTINS, T.F.; SOARES, H.S.; CABRERA, R.R. Cross-mating experiments with geographically diferente populations of *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae). **Exp.Appl.Acarol.** 54:41–49, 2011

LABRUNA M. B, et al . Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Rev.MVZ Cordoba**, Córdoba , v. 16, n. 2, p. 2435-2457, May 2011.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J.; LEMOS, E. R. S. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 2, p. 149-151. Suppl. 12. 68, 2008.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D.L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p.2715-2727, 1997

LATROFA, M.S., DANTAS-TORRES, F., GIANELLI, A., OTRANTO, D. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group. **Ticks Tick-borne Dis.** 5, 943–946, 2014.

LEE, M. J.; YU, D. H.; YOON, J. S.; LI, Y. H.; LEE, J. H.; CHAE, J. S.; Park, J. Epidemiologic and clinical surveys in dogs infected with *Babesia gibsoni* in South Korea. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 681–686, 2009.

LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S.; DE MORAIS, H. S. et al. The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. **J Vet Intern Med**, v.15, p.445-452, 2001.

LEMOS E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A, FREIRE, N. M. S. Infestation by ticks and detection of antibodies to spotted fever group rickettsiae in wild animals captured in the state of São Paulo, Brazil. A preliminary report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 701-702, 1996.

LEMOS E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A. M; CHAGASI, N. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996a.

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.

LEONARD, J.A., WAYNE, R.K., WHEELER, J., VALADEZ, R., GUILLEN, S., VILA, C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**, v. 298, p. 1613-1616, 2002.

LEWIS G, HUXSOLL D, RISTIE M, JOHNSON A. Experimentally induced infection of dogs, cats and no humans primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine Ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, 36: 85-88, 1975.

LIMA, M.L.F.; SOARES, P.T.; RAMOS, C.A.N.; ARAÚJO, F.R.; RAMOS, R.A.N.; SOUZA, I.I.F.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.A molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in brazil Brazilian **Journal of Microbiology**, 41: 381- 385, 2010.

LIN M, ZHU M, RIKIHISA Y. Rapid activation of proteine tyrosine kinase and phospholipase C-gamma 2 and increase in cytosolic free calcium are required by *Ehrlichia chaffeensis* for internalization and growth in THP-1 cells. **Infection and Immunity** 70:889-898, 2002.

LIN M, RIKIHISA Y. Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol anchored proteins. **Cell. Microbiol.** 5:809–20, 2003.

LITTLE, S. E.; Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats **Vet Clin Small Anim** 40, 1121–1140, 2010.

LITTLE T, HULTMARK D, READ AF. Invertebrate Immunity and the limits of mechanistic immunology. **Nat Immunol** 6:651-654, 2005.

LIU H, BAO W, LIN M, NIU H, RIKIHISA Y. Ehrlichia type IV secretion effector ECH0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD. **Cell. Microbiol.** 14:1037–50, 2012.

LLEDÓ, L., GIMÉNEZ-PARDO, C., DOMINGUEZ-PEÑAFIEL, G., GEGÚNDEZ, I., CASADO, N., CRIADO, A., et al. Molecular detection of hemoprotozoa and Rickettsia species in arthropods collected from wild animals in the Burgos Province, Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 10,735-738, 2010.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Princeton**, v. 20, n. 4, p. 418-431,1998.

LOBETTI, R.G., REYERS, F, NESBIT, J.W. The comparative role of hemoglobinemia and hypoxia in the development of canine babesial nephropathy. **Journal of the South African Veterinary Association**, 67, 188-198, 1996

LOCKHART J, DAVIDSON W, STALLKNECHT D, DAWSON J. Lack of seroreactivity to *Ehrlichia chaffeensis* among rodent populations. **Journal of Wildlife Disease**, 34:392–396, 1998.

LOFTIS AD , REEVES WK , SZUMLAS DE , ABBASSY MM , HELMY IM , MORIARITY JR , DASCH GA. Surveillance of Egyptian fleas *Coxiella* , *Ehrlichia* , *Rickettsia* , and *Yersinia pestis* . **Am J Trop Med Hyg** 75: 41 – 48, 2006.

LOPEZ-VELEZ, ROGELIO; MOLINA MORENO, RICARDO. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. **Rev. Esp. Salud Publica, Madrid**, v. 79, n. 2, abr. 2005

LÓPEZ J AK, AZÓCAR T. Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. **Revista Chilena de Infectología** ;24(3):189-193, 2007.

LORETTI, AP. BARROS, SS. Parasitismo por *Rangelia vitalli* em cães (“nambiuví”, “peste de sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos Do Instituto Biologico (Sao Paulo)**, v. 71, n. 1, p. 101-131, 2004.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**; v.134, n.3-4, p.193-213, 2005

LOSOS, G.J. Ehrlichiosis. In (Ed) LOSOS, G.J. Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals. Longman Scientific Technical, Canada. p. 796-816, 1986.

LOULY, C. C. B. Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus*, no canil da polícia militar de Goiânia-Goiás, Brasil. 2003, 54 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de Alimentos), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

MACHADO R, DUARTE J, DAGNONE A, SZABÓ M. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, 139(1-3)262-266, 2006.

MACIEIRA, D. B. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MACKENSTEDT, U.; GAUER, M.; MEHLHORN, H. et al. Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. **Parasitol Res**, v.76, p.199-206, 1990.

MAIA, M. G. Aspectos epidemiológicos da babesiose canina em área semi-árida do estado de Minas Gerais. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Medicina Veterinária Preventiva). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.

MANSUETO P, VITALE G, CASCIO A, SEIDITA A, PEPE I, CARROCCIO A, et al. New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. **Clin Dev Immunol**. vol. 2012, Article ID 967852, 26 pages, 2012.

MARQUÉZ, I. Diagnóstico de enfermedades hemáticas en caninos en la ciudad de milagro mediante el uso de kits snap 4dx. Tesis presentada para la obtención del título de médico veterinario y zootecnista. Universidad de guayaquil facultad de medicina veterinaria y zootecnia. 2011. 144 pag

MARTÍNEZ M, GUTIÉRREZ C, MONGER F, RUIZ J, WATTS A, MIJARES V, ROJAS M, TRIANA-ALONSO F. *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. **Emerging Infectious Disease**, 14(3): 519-20, 2008

MARTINOD, S., BROSSARD, M., MOREAU, Y. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic areas. **J. Parasitol.**, v. 71, p. 269-73, 1985.

MATIJATKO, V.; KIŠ, I.; TORTI, M. et al. Systemic inflammatory response syndrome and multiple dysfunction syndrome in canine babesiosis. **Veterinarski Arhiv**, v.80, p.611-626, 2010.

MATJILA, P., PENZHORN, L., BEKKER, J., NIJHOF; M., JONGEJAN, F. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. **Vet Parasitol**, 122,119-125, 2004.

MATJILA, P., NIJHOV, M., TAOUFIK, A., HOUWERS, D., TESKE, E., PENZHORN, L., et al. (2005) Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. **Vet Parasitol**, 131, 23–29, 2005.

MATSUU A, KAWABE A, KOSHIDA Y, et al. Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. **J Vet Med Sci**, 66(8):893–7, 2004

MAVROMATIS K, DOYLE C, LYKIDIS A, IVANOVA N, FRANCINO M, CHAIN P, SHIN M, MALFATTI S, LARIMER F, COPELAND A, DETTER J, LAND M, RICHARDSON P, YU X, WALKER D, MCBRIDE J, KYRPIDES N. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, 188:4015–4023, 2006.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. Columbia: American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, v. 8, n. 4, p. 441-447, Oct. 1996.

MCBRIDE J, NDIP L, POPOV V, WALKER D. Identification and Functional Analysis of an Immunoreactive DsbA-Like Thio-Disulfide Oxidoreductase of *Ehrlichia spp.* **Infection and Immunity**, 70:2700-2703, 2002.

MERHEJ V, RAOULT D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** 86:379–405. 2011.

MIURA K, RIKIHISA Y. Virulence Potential of *Ehrlichia chaffeensis* Strains of Distinct Genome Sequences. **Infection and Immunity**, 75(7):3604-3613, 2007.

MOLITERNO F. Febre Maculosa Brasileira: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Laboratoriais dos Casos Ocorridos no Estado do Rio de Janeiro no Período de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2008. Rio de Janeiro. Mestrado [Dissertação em Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz, 2009.

MORAES-FILHO, J., MARCILI, A., NIERI-BASTOS, F.A., LABRUNA, M.B. Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America: molecular evidence for the presence of two distinct species. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J., MARCILI, A., NIERI-BASTOS, F., RICHTZENHAIN, L.J., LABRUNA, M.B., Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Act. Trop.** 117, 51–55, 2011a.

MORITA T, SAEKI H, IMAI S. Reactivity of anti-erythrocyte antibody induced by *Babesia gibsoni* infection against aged erythrocytes. **Vet Parasitol**, 58(4):291–299, 1995.

MOSHKOVSKI S. Cytotropic inducers of infection and the classification of the *Rickettsiae* with *Clamidozoa*. **Advance in Modern Biology**, 19:1-44, 1945.

MORO P, SHAH J, LI O, GILMAN R, HARRIS N, MORO M. Serologic Evidence of Human Ehrlichiosis in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 80(2): 242-244, 2009.

MOTT J, BARNEWALL R, RIKIHISA Y. Human granulocytic Ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. **Infection and Immunity**, 67:1368-1378, 1999.

MOTT, J.; RIKIHISA, Y.; TSUNAWAKI, S.; Effects of *Anaplasma phagocytophilum* NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells. **Infection and Immunity, Bethesda**, v. 70, n. 3, p. 1359-66, 2002.

MOUMÈNE A, DAMIEN F. MEYER. Ehrlichia's molecular tricks to manipulate their host cells, **Microbes and Infection**, Volume 18, Issue 3, March 2016, Pages 172-179, 2016.

MUNDIM, A. V.; MORAIS, I. A.; TAVARES, M. CURY, M. C.; MUNDIM, M. J. S. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by Hepatozoon sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 3-8, 2008.

MURPHY GL, EWING SA, WHITWORTH LC, FOX JC, et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.** 79: 325-339, 1998.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby, Elsevier. Cap.44. Rickettsia and Orientia 427-434. 960p. 2009.

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

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. **Vet. Parasitol.** 190, 547–555, 2012.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.** Apr;5(3):252-276, 2014.

NDIP L, NDIP R, ESEMU S, WALKER D, MCBRIDE J. Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon. **Experimental and Applied Acarology**, 50 (2):163-168, 2009.

NEER, T. M.; Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. 934 p. cap. 28, p. 139-154, 1998.



NEER TM, HARRUS S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: Greene CE, editor. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd edition. St Louis (MO): Saunders Elsevier; 2006. p. 203–16.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN M. R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia: J.B. Lippincott, v. 16, n. 3, p. 309-315, May-June 2002.

NEITZ, W. O.; THOMAS, A. D. Rickettsiosis in the Dog. **Journal of South African Veterinary Association, Petroria**, v. 9, p. 166-174, 1938.

NELSON. R. W; COUTO. C. G. Medicina interna de pequenos animais. Editora Elsevier, 4ª edição. Rio de Janeiro - RJ, 2010. Páginas: 1325 e 1326

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000, 428p.

NICHOLSON WL, PADDOCK CD, DEMMA L, et al. Rocky Mountain spotted fever in Arizona: documentation of heavy environmental infestations of *Rhipicephalus sanguineus* at an endemic site. **Ann N Y Acad Sci**, 1078:338–41, 2006.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 773-778, Feb. 1999.

NUNES E, VIZZONI VF, NAVARRO DL, et al. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 110(8):1058-1061, 2015

NUTT AK, Y RAUFMAN J. Gastrointestinal and hepatic manifestations of human Ehrlichiosis: 8 cases and a review of the literature. **Dig. Dis**. 17:37–43, 1999.

NYINDO. M; RISTIC. M;HUXSOLL. D; SMITH. A. Tropical canine Pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. American Journal of **Veterinary Research**, 32(11):1651-1659, 1971.

NYSTRÖM, P.O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. **J. Antimicrob. Chemother**. 41 (Suppl. A), 1–7, 1998.

O'DWYER, L. H. & MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. 1ª ed. Rio de Janeiro. L. F. Livros de Veterinária LTDA. p. 57-67, 2002.

O'DWYER, L.H., MASSARD, C.L., DE SOUZA, J.C.P. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol**. 94, 143–150, 2001.

OGRZEWALSKA M, SARAIVA DG, MORAES-FILHO J, MARTINS TF, COSTA FB, PINTER A, LABRUNA MB. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of Sao Paulo, Brazil. **Parasitology**. Sep;139(10):1283-300, 2012.

OHASHI N, RIKIHISA Y, UNVER A. Analysis of transcriptionally active gene clusters of major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis*. **Infection and Immunity** 69:2083–2091, 2001.

OINES, O., STORIL, K., BRUN-HANSEN, H. First case of babesiosis caused by *Babesia canis* in a dog from Norway. **Vet Parasitol**, 4,171(3-4),350-3, 2010.

OLANO J, WALKER D. Human Ehrlichioses. **Medical Clinics of North America**, 86:375-392, 2002.

OLIVEIRA, D. et al. Anti- *Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

OLIVEIRA, KA, OLIVEIRA, LS, DIAS, CCA, SILVA JR, A, ALMEIDA, MR, ALMADA, G, BOUYER, DH, GALVÃO, MAM, MAFRA, CL. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103(2), 191-194, 2008.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: A key to phylogeny. **FASEB Journal**. v.7 n.1 p.113-123. 1993.

OLSON JG, MCDADE JE. *Rickettsia* and *Coxiella*. In: Murray P. R. Manual of Clinical Microbiology. 6. ed. Washington: ASM PRESS, 1994, p. 678-684.

OSCHEROV, E.B., MILANO, A.M.F., LOBO, B., ANDA, P., ESCUDERO, R. Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. **Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.** 70, 42–48, 2011.

OYAMADA M, DAVOUST B, BONI M, DEREURE J, BUCHETON B, HAMMAD A, ITAMOTO K, OKUDA M, INOKUMA H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of Eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clin Diagn Lab Immunol**, 12:1343-1346, 2005.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S.; SOUZA, C. E.; SZABO, M. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, May-June 2009.

PACHECO RC, MORAES-FILHO J, GUEDES E, SILVEIRA I, RICHTZENHAIN LJ, LEITE RC, LABRUNA MB. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med Vet Entomol**, Jun;25(2):148-55, 2011.

PADDOCK C, CHILDS J. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Review** 16(1):37-64, 2003.

PADDOCK C, SUMNER J, SHORE G, BARTLEY D, ELIE R, MCQUADE J, MARTIN C, GOLDSMITH C, CHILDS J. Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 35:2496-2502, 1997.

PADDOCK C, FOLK S, SHORE G, MACHADO L, HUYCKE M, SLATER L, LIDDELL A, BULLER R, STORCH G, MONSON T, RIMLAND D, SUMNER J, SINGLETON J, BLOCH K, TANG Y, STANDAERT S, CHILDS J. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. **Clinical Infectious Disease** 33(9):1586-94, 2001.

PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMMER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 687-692, 2008.

PALMAS, C., BORTOLETTI, G., CONCHEDDA, M. et al. Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parassitol**, v.43, p.29-35, Suplemento 1, 2001.

PAROLA P , CORNET JP , SANOGO YO , MILLER RS , THIEN HV , GONZALEZ JP , RAOULT D , TELFORD IS , WONGSRICHANALAI C . Detection of Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam . **J Clin Microbiol** 41: 1600 – 1608, 2003.

PAROLA P.; PADDOCK C. D.; RAOULT D. Tick-borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 657-702, Oct. 2013.

PAT-NAH H, RODRIGUEZ-VIVAS RI, BOLIO-GONZALEZ ME, VILLEGAS-PEREZ SL, REYES-NOVELO E. Molecular Diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. **J Med Entomol**. 52: 101-104, 2015.

PENNISI MG, ALONGI A, AGNONE A, VITALE F, REALE S, TORINA A: Cats as reservoir of *Babesia microti*. **Parassitologia**, 49(Suppl 1):100, 2007.

PETROVEC, M.; LOTRIC-FURLAN, S.; AVSIC-ZUPANC, T. ET AL. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, 35: 1556-1559, 1997.

PICKEN, R. N. Polymerase chain reaction primers and probes derived from *flagellin* gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. **J. Clin. Microbiol.** 30: 99-114, 1992.

PINTER, A., HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted

fever in the state of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

PINYOOWONG, D.; SATHAPORN, J.; SUKSAWAT, F.; STICH, R. W.; THAMCHAIPENET, A.; Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution** 8 , 433- 438, 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 696-701, Nov. 2008.

PIRANDA EM, FACCINI JL, PINTER A, PACHECO RC, CANCADO PH, LABRUNA MB. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsii*, Using Experimentally Infected Dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis**, Jan;11(1):29-36, 2011.

POPOV V, HAN V, CHEN S, DUMLER J, FENG H, ANDREADIS T, TESH R, WALKER D. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology** 47: 235-251, 1998.

POPOV VL, YU X, WALKER DH. The 120 kDa outer membrane protein of *Ehrlichia chaffeensis*: preferential expression on dense-core cells and gene expression in *Escherichia coli* associated with attachment and entry. **Microb. Pathog.** 28:71–80, 2000.

PORCHET, M. J.; SAGER, H.; MUGGLI, L.; OPPLIGER, A.; MULLER, N.; FREY, C.; GOTTSTEIN, B. A descriptive epidemiological study on canine babesiosis in the Lake Geneva region. Schweiz. **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, v. 149, p. 457–465, 2007.

PRESCOTT L, HARLEY J, KLEIN D. Microbiología. España. 4ª Edición. McGraw-Hill Interamericana 1999; 475-476.

PREZIOSI, D. E.; COHN, L. A. The increasingly complicates story of Ehrlichia. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, [S.l.]: Veterinary Learning System, v. 24, n. 4, p. 277-288, Apr. 2002.

PROCOP GW, BURCHETTE JL JR, HOWELL DN, et al. Immunoperoxidase and immunofluorescent staining of *Rickettsia rickettsii* in skin biopsies. A comparative study. **Arch Pathol Lab Med**, 121(8):894–9, 1997.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; MARKEY, B. K.; TORGERSON, P. R. Bacterial diseases. Microbial and parasitic diseases of the dog and cat. London: Saunders, 1997, p. 229-33.

RAMOS, C.A.N., RAMOS, R.A.N., ARAUJO, F.R., GUEDES JR, 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. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 18, 58-62, 2009.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (northeastern Brazil). **Parasitology Research** Volume 107, Number 5, 1115-1120, 2010.

RAMOS, R.A.N., LATROFA, M.S., GIANELLI, A., LACASELLA, V., CAMPBELL, B.E., DANTAS-TORRES, F., OTRANTO, D.E. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group by a quantitative real-time PCR. **Vet. Parasitol.** 205(1-2), 285–288, 2014.

RANDOLPH S. Tick-borne encephalitis in Europe. **Lancet** 358:1731-2, 2001.

REEVES WK , NELDER MP , KORECKI JA. Bartonella and Rickettsia in fleas and lice from mammals in South Carolina, USA . **J Vector Ecol** 30: 310 – 315, 2005.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. **Journal of Bacteriology** , n. 173, p. 1576-1589, 1991.

RIBEIRO, M.F.B., LIMA, J.D., PASSOS, L.M.F., GUIMARAES, A.M. Frequência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 42, 511–517, 1990.

RIBEIRO, V et al . Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 27, n. 2, p. 285-289, June 1997 .

RIBEIRO, T. C.; BRITTO, A. M. A.; GONÇALVES, L. M.; JUNIOR, E. S. S.; ALMOSNY, N. R. P.; MACIEIRA, D. B. Infecções por piroplasmas em cães domiciliados na cidade de Niterói – RJ atendidos no HUVET-UFF. In: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Gramado, Brasil. 2014.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; Tribe II, *Ehrlichiae* (Philip, 1957). In : HOLT, John, G. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Gram-negative bacteria of general, medical, or industrial importance*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 4v. v.1, cap. Sec. 9, p.704-709.

RISTIC, M., Y C. J. HOLLAND. 1993. Canine ehrlichiosis, p. 169-186. In Z. Woldehiwet, and M. Ristic (ed.), Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. PergamonPress, Oxford, United Kingdom.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and Ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews.** v.4 n.3 p.286-380, 1991.

RIKIHISA, Y. Ehrlichial strategy for survival and proliferation in leukocytes. **Subcell. Biochem.** 33:517–538, 2000.

RIKIHISA Y. Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Parasitology**, 167:155-166, 2009.

RIKIHISA Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature Reviews – Microbiology* 8: 328-339, 2010.

RIKIHISA Y. Molecular Pathogenesis of *Ehrlichia chaffeensis* Infection. *Annu Rev Microbiol.* 69:283-304, 2015.

RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; FOX, J.C et al. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.143-148, 1991.

RIKIHISA Y, BARNEWALL RE. Abrogation of gamma interferon induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. *Infect. Immun.* 62:4804-4810, 2002.

RIKIHISA, Y., S. YAMAMOTO, I. KWAK, Z. IQBAL, G. KOCIBA, J. MOTT. C-reactive protein and l-acidglyco protein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 32: 912-917, 1994.

RIKIHISA Y, ZHI N, WORMSER GP, WEN B, HOROWITZ HW, HECHERY KE. Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. *J Infect Dis* 175:210-213, 1997.

RODANICHE EC, RODANICHE A. Spotted fever in Panama: isolation of the etiologic agent from a fatal case. *Am J Trop Med*, 30: 511–17, 1950.

RODRIGUES, A.F.S.F., D'AGOSTO, M., DAEMON, E. *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) (Apicomplexa: Babesiidae) em caes de rua do Município de Juiz de Fora, MG. *Rev. Bras. Med. Vet.* 24, 17–21, 2002.

RODRIGUES, J. P.; PÁDUA, S. B; FRAZÍLIO, F.O. ; DORETO, D.C. , MARCONDES, J. A. A.; ARAÚJO, A. M. M. ; ARAGÃO, A. A. Prevalência de hemoparasitas em cães do município de Dourados-MS: Resultados Preliminares 350 CONBRAVET Gramado/RS Brasil 19 a 22 out 2008.

ROHRBACH, B. W., J. R HARKESS, S. A. EWING, J. KUDLAC, G. L. MCKEE. Epidemiologic and clinical characteristics of persons with serologic evidence of *E. canis* infection. *Am J Publ Health* 80: 442-445, 1990.

ROJAS TRIVINO, ADRIANA RUEDA HURTADO, JAVIER BENAVIDES, KAROL IMBACHI LOPEZ, LEONARDO ALVAREZ RIOS, RODRIGO LOPEZ BERMUDEZ. Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinariay Zootecnia* 7 (1) p.37 - 48, 2013.

ROLAND W, EVERETT E, CYR T, HASAN S, DOMMARAJU C, MCDONALD G. *Ehrlichia chaffeensis* in Missouri ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:641–643, 1998.

ROTONDANO, T. F. Doenças transmitidas por carrapatos em cães nas mesorregiões do sertão e agreste do Estado da Paraíba 2014. 130p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2014.

RYMASZEWSKA, A.; GREENDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review **Veterinarni Medicina**, v53 n11, 573–584, 2008.

SAGER, H., CASATI, S., HARTMEIER, G., SOMMER, B. Autochthonous case of canine babesiosis in the canton Solothurn. **Schweiz Arch Tierheilkd**, 147, 259–265, 2005.

SAINZ A, AMUSATEGUI I, RODRÍGUEZ F, TESOURO M. Las Ehrlichiosis en el perro: presente y futuro. **Profesión Veterinaria**, 12(47): 22-28, 2000.

SALES, K. G.; BRAGA, F. R. R.; SILVA, A. C. F.; MURARO, L. S.; SIQUEIRA, K. B. Estudo retrospectivo (2006) da erlichiose canina no Laboratório do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá. **Acta Scientiae Veterinariae** 35 (Supl 2):s500-502, 2007.

SANGIONI, L. A. Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica no estado de São Paulo. 86 f. Tese (Doutorado em epidemiologia experimental aplicada à zoonose) - Universidade de São Paulo, 2003.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVAO, M. A.; SCHUMAKER, T. T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsia! infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, Feb. 2005.

SAN MIGUEL, S. Y. 2006. Prevalencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la provincia de Sullana. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Alas Peruanas. p 51.

SANOGO, Y.O., DAVOUST, B., INOKUMA, H., CAMICAS, J.L., PAROLA, P., BROUQUI, P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 70, 205–212, 2003.

SANTOS-SILVA, M.M., SANTOS, A.S., SOUSA, R., CASIMIRO, E., ESTRADA-PEÑA, A., LOPES, D., QUEIJO, E., DORETA, A. & BACELLAR, F. (2009). Os ixodídeos em Saúde Pública. In Carlos Borrego *et al.* (Eds.), *Investigação em Ambiente e Saúde: Desafios e Estratégias*. (pp. 65-69). Universidade de Aveiro, CESAM: Incograf

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, 2009a.

SASAKI M, OMOBOWALE O, TOZUKA M, OHTA K, MATSUU A, NOTTIDGE HO, HIRATA H, IKADAI H, OYAMADA T. Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. **J Vet Med Sci**, 69:1191-1193, 2007.

SCHETTERS, T.P.M. et al. Parasite localization and dissemination in the *Babesia*-infected host. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Londres, v.92, p.513–519, 1998.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, v.12, n.8, p.1788–1809, 2012.

SCHRIEFER, M.E.; SACCI, J.B.; DUMLER, S.; BULLEN, M.G.; AZAD, A.F. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *Journal of Clinical Microbiology*. v.32, n.4, p.949-954, 1994.

SELLON RK. Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33:677-693, 2003.

SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA (SENAMHI) – PERU. Información del tiempo, clima y agua. Disponível em: <<http://www.senamhi.gob.pe/>> Acesso 14 de julio 2015.

SHAW, S., DAY, M. (2005). Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat. Manson Publishing. UK. ISBN: 1-8407657-5. Pag. 63-70;120-125

SHAW, S. E.; DAYB, M. J.; BIRTLESC, R. J. et al. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol*, v.17, p.74-80, 2001.

SHIBATA S, KAWAHARA M, RIKIHISA Y, FUJITA H, WATANABE Y, SUTO S, ITO T. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* Ticks in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4):1331-1338, 2000.

SIARKOU, V.I.; MYLONAKIS, M. E.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; KOUTINAS, A. F.; Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis – *Veterinary Microbiology* 125, 304-312, 2007.

SILVA, L. D. S. Erliquiose e anaplasmosse canina em Teresina, Piauí. Dissertação (Mestrado) em Sanidade e Reprodução Anima. Universidade Federal do Piauí, TERESINA/PI, 2010.

SILVA, M.M., SANTOS, A.S., FORMOSINHO, P. E BACELLAR, F. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48, 2006.

SILVA, JOSÉ NIVALDO DA, ALMEIDA, ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE, BOA SORTE, EVELINE DA CRUZ, FREITAS, AGRÁDIA GONÇALVES DE, SANTOS, LUANA GABRIELA FERREIRA DO, AGUIAR, DANIEL MOURA, SOUSA, VALÉRIA RÉGIA FRANCO. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(2), 108-111, 2010.

SILVA MVM, FERNANDES RA, NOGUEIRA JL, AMBRÓSIO CE. Erliquiose canina: revisão de literatura. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 14: 139-143, 2011.

SILVA, A. B.; COSTA, A. P.; SÁ, J. C.; COSTA, F. B.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na mesorregião do oeste maranhense, nordeste brasileiro. *Ciência Animal Brasileira*, v.13, p. 388-395, 2012.



SISTEMA DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA PARA EMPRENDEDORES. Disponível em: <http://sige.inei.gob.pe/sige/> (ACCESO: 12/11/2015)

SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT, E.D. Tick-bourne infectious diseases of dogs. **Trends in parasitology**. v.17 n.2 p.74-80, 2001.

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 Fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139-151, June 2012.

SOARES, J. F.; CARVALHO, L.; MAYA, L.; DUTRA, F.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 210, p. 98–101, 2015.

SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; CARLI, E.; CARCY, B.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Veterinary Parasitology**, v.157, n.3-4, p.211-221, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L. BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, 181(1), 48-60, 2011.

SONENSHINE, DE. Biology of Ticks. Oxford University Press; New York: 1991.

SOUZA J, SOARES C, OLIVEIRA C, MASSARD C. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba. **Ciência Rural**, 31(2), 309-314, 2001.

SOUZA, B. M. P. S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

SPAGNOL, C.; LORETTI, A.; CORRÊA, A.; PESCADOR, C.; ROZZA, D.; CONCEIÇÃO, E.; COLODEL, E.; OLIVEIRA, R.; BREITSAMATER, I.; BARROS, S.; OLIVEIRA, L.; DRIEMEIER, D. Parasitismo de cães por *Rangelia vitalii* no Estado do Rio Grande do Sul. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2003, Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: 2003. p.232-233. Resumo 211

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201–206, 2010.

SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. D. M.; CAMPOS, W. N. D. S.; MELO, A. L. T.; IGARASHI, M.; AMUDE, A. M.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.3, p.253-255, 2011.

STANDAERT SM, DAWSON JE, SCHAFFNER W, CHILDS JE, BIGGIE KL, SINGLETON JR J, GERHARDT RR, KNIGHT ML, HUTCHESON RH. Ehrlichiosis in a golf-oriented retirement community. **N. Engl. J. Med.** 333:420–425, 1995.

STANDAERT SM, YU T, SCOTT MA, CHILDS JE, PADDOCK CD, NICHOLSON WL, SINGLETON J, BLASER MJ. Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. **J. Infect. Dis.** 181:1082–1088, 2000.

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

STOBBE N.S., CHAPLIN E.L., PAIVA M.G.S., SILVA N.R.S., ARAÚJO F.A.P. FORTES E. 1992. Diagnóstico de hemoparasitose através da técnica de distensão de gota de coágulo sanguíneo. **Braz. J. Res. Anim. Sci.** 29:390-393, 1992.

STOTHARD DR, FUERST PA. Evolutionary Analysis of the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* Using 16S rRNA Gene Sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, 18(1):52-61, 1995.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias-SP. **Febre Maculosa**: informações para profissionais da saúde. Acessado dia 10/04/2017. Disponível no site: <http://www.sucen.sp.gov.br>

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **J. Clin. Microbiol**, v. 39, n.1, p. 90-93, 2001a.

SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y.; HANCOCK, S.I.; HEGARTY, B.C.; NILKUMHAMG, P.; BREITSCHWERDT, E.B. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-born pathogens in dogs from Thailand. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 15. p.453-462. 2001.

SUMNER J, NICHOLSON W, MASSUNG R. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, 35:2087–2092, 1997.

SUMNER J, CHILDS J, PADDOCK C. Molecular cloning and characterization of the *Ehrlichia chaffeensis* variable-length PCR target: an antigen-expressing gene that exhibits interstrain variation. **Journal of Clinical Microbiology** 37:1447–1453, 1999.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and miscellaneous infection. In: ETTINGER, S.J. (Ed.). Textbook of veterinary internal medicine. Philadelphia: W.B. Saunders. p.265-297, 1989.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M.; FERREIRA, F. A.; PAJUABA NETO, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 72–74, 2010.

SZABÓ MPJ, PINTER A, LABRUNA MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol** 3:27, 2013.

TABAR, D., FRANCINO, O., ALTET, L., SÁNCHEZ, A; FERRER, L., ROURA, X. PCR survey of vector borne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniosis. **Vet Rec**, 164,112-116, 2009.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 2nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders, p. 473-481, 1998.

TABOADA, J, LOBETTI, R. (2006). Babesiosis. In C.E. Greene (Ed.), Infectious diseases of the dog and cat. (3rd ed.). (pp. 722-736). Philadelphia: Saunders, Elsevier.

TANIKAWA A, COSTA FB, LABRUNA MB, AZEVEDO SS. A survey for rickettsial on *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) ticks in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 50(5): 414-417, 2013.

TARRADAS, C., GONZÁLEZ, M., MALDONADO, A., CARBONERO, A., ASTORGA, R., VILAPLANA, F., BORGE, C., LUQUE, I. Estudio Epidemiológico de la Ehrlichiosis y Enfermedad de Lyme en perros de la provincia de Cádiz (España) In: Resumos das comunicações do Congresso ciências veterinárias 2008 que engloba o IV Congresso da SPCV e o I Congresso Ibérico de Epidemiologia Veterinária. INRB INIA/Fonte Boa, Santarém, Portugal. 2008.

TATEISHI T., V., LÍ E., O., HOYOS S., L., RIVERA G., H., MANCHEGO S., A., BARRIOS A., L., & MORE B., J. Identificación Hematológica y Molecular de Anaplasma platys en Caninos Domésticos de Lima Metropolitana con Signos Clínicos Compatibles con Anaplasmosis. **Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú**, 26(1), 111-118, 2015.

TELFORD SR, 3rd, Parola P. Arthropods and Rickettsiae. In: Raoult D, Parola P, editors. Rickettsial Diseases. New York: Informa Health Care; 2005. p. 27-36.

THOMAS, R. J., J. S. DUMLER, AND J. A. CARLYON. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** 7:709–722, 2009.

TODOROVIC, R. A. Serological diagnosis of babesiosis: A review. **Trop Anim Health Prod**, v.7, p.1-14, 1975.

TOMASSONE L, NUÑEZ P, GÜRTLER RE, CEBALLOS L, OROZCO M, KITRON U, FARBER M. Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. **Emerging Infectious Disease**, 14(12): 1953-1955, 2008.

TRAPP, S.M., DAGNONE, A.S., VIDOTTO, O., FREIRE, R.L., AMUDE, A.M., MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet. Parasitol.** 140, 223–230, 2006.

TROY, G. C. e FORRESTER, S. D. Canine Ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. Infectious Disease of the Dog and Cat. Philadelphia, W B Saunders Co, p.404-418, 1990.

UENO, T. E. H., AGUIAR, D. M., PACHECO, R. C., RICHTZENHAIN, L. J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C., MEGID, J., LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, jul-set, 2009.

UILENBERG, G. Babesia—A historical overview. **Vet Parasitol**, v.138, p.3–10, 2006.

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

UNGAR DE SÁ, M. F. M.; UNGAR DE SÁ, J. E.; BITTENCOURT, D. V. V.; BISPO, A. C.; RÉGIS, A. M. M.; SOUZA FILHO, N. D. J.; FRANKE, C. R. (2007). Estudo retrospectivo dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e região metropolitana, Bahia, no período de 1991-2005. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.3, p.178-183, 2007.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 990, 692-698, 2003.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KARAMAN, M.; OZEN, H. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis* **Clinical Microbiology and Infection** 15(Supl 1):1–3, 2009.

VADILLO S, PIRIZ S, MATEOS E. Manual de Microbiología Veterinaria. México. McGraw-Hill 2002; 853.

VALBUENA G, WALKER DH. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. Thrombosis and haemostasis, 102(6):1071-1079, 2009.

VALLI, V.E.O. Hematopoietic system. In: MAXIE, M.G. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. Philadelphia: Elsevier, 2007. v.3, cap. 2, p.107-324.

VARGAS-HERNÁNDEZ G., ANDRÉ M.R., FARIA J.L., MUNHOZ T.D., HERNANDEZ-RODRIGUEZ M., MACHADO R.Z., TINUCCI-COSTA M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology** 25: 254-260, 2012.

VASCONCELOS, M. F. Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal. 2010. 85p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília-DF.

VASCONCELOS, M. F.; PALUDO, G. R.; BITTENCOURT, R. F.; MARÇOLA, T. G.; FIRMINO, F. de P.; CHIARELI, R. A. Frequência de hemoparasitoses em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, Brasil. “Frequency of hemoparasitosis in dogs attended at Veterinary Hospital from University of Brasília, Brazil.” 350 CONBRAVET Gramado/RS Brasil 19 A 22 out 2008.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Veterinary Parasitology** ; v.138, p.147-160, 2006.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 58-62, 2004.

VIDOTTO, M. C., T. C. MCGUIRE, T. F. MCELWAIN, G. H. PALMER, AND D. P. KNOWLES, JR. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. **Infect. Immun.** 62:2940-2946, 1994.

VILELA, J. A. R.; PIRES, M. S.; DA SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; FALQUETO, A.; SANTOS, H. A. 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

VINASCO J, LI O, ALVARADO A, et al. Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America . **Journal of Clinical Microbiology**, 45(8):2716-2719, 2007.

WALKER D. Diagnosing human ehrlichioses: current status and recommendations. **American Society for Microbiology News**, 66: 287–291.98, 2000.

WALKER, D.H. Rickettsia rickettsii as virulent as ever. **American journal of tropical medicine and hygiene. Northbrook**, v.66, n.5, p. 448-449, 2002.

WALKER DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 39-44, Supplement, 1, 2007.

WALKER D.; DUMLER S. Emergence of the Ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Disease**, 2: 18-29, 1996.

WALKER DH, VALBUENA GA, OLANO JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by Rickettsia. **Ann N Y Acad Sci**, 990:1–11, 2003.

WALKER D, BOUYER DH. Rickettsia. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM PRESS, 2003. p. 1005-1014.

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. **Vet. Parasitol.**, v. 69, p. 307–317, 1997.

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

WEISER MG, THRALL MA, FULTON R, et al. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **J Am Anim Hosp Assoc**, 27:84–88, 1991

WEISS, E.; DASCH, G.A. The Family Rickettsiaceae: pathogens of domestic animals and invertebrates; nonpathogenic arthropod symbiotes. In (Ed.) STARR, M.P. The Prokarya. Springer-Verlag. Berlin, p. 2161-2171, 1981.

WEISS E, MOULDER JW. Order in Rickettsiales. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1, Noel R Krieg (editor), Baltimore, Wilians & Wilkins,1984: 687-704.

WELLER, S. J. BALDRIDGE, G. D.; MUNDERLOH, U. G.; NODA, H.; SIMSER, J.; KURTTI, T. J. Phylogenetic placement of Rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 36, p. 1305- 1317, 1998.

WELZL, C.; LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S.; VAUGHAN-SCOTT, T.; MYBURGH E. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 72, n. 3, p. 158-162, 2001.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, C. G.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested-PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.7,p.1852-1855, 1997.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, 1999.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, supl. 2, p. 3811-3822, 2013.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S.l.]: WB Saunders Co., v. 21, n. 1, p. 75-98, Jan. 1991.

WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon Press, 1993. p. 427

XAVIER M. Estudos de Hemoparasitos por evidências morfológicas, sorológicas e moleculares, com ênfase na família Anaplasmataceae em *Canis familiaris* L., na região litorânea do Estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) em Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

XAVIER, M.S., FONSECA, C.N., FERREIRA, R.F., CASTRO, T.X., NEVES, F.P.G., BARBOSA, A.V., CERQUEIRA, A.M.F., ALMOSNY, N.R.P. Wolbachia spp. interfere na detecção molecular de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães com microfilaremia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 67(4): 1197-1200, 2015.

YAMANE, I.; THOMFORD, J. W.; GARDNER, I. A.; DUBEY, J. P.; LEVY, M.; CONRAD, P. A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1579-1584, 1993.

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

YEAGLEY T, MASON V. REICHARD, JULIE E. HEMPSTEAD, KELLY E. ALLEN, LINDSEY M. PARSONS, MELLANIE A. WHITE, SUSAN E. LITTLE, AND JAMES H. MEINKOTH. Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* ‘Spanish isolate’ in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 235:5, 535-539, 2009.

YU X, CROCQUET-VALDES P, WALKER D. Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunodominant protein of *Ehrlichia chaffeensis*. **Gene**, 184:149–154, 1997.

YU X, MCBRIDE J, ZHANG X, WALKER D. Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. **Gene**, 248:59–68, 2000.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; ZWEYGARTH, E.; FUKATA, T.; MAEDE, Y.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. *Babesia gibsoni* of dogs from North America and Asia belong to different species. **Parasitology**, v.120, n.4, p.:365–369, 2000.

ZHANG X, ZHANG J, LONG S, RUBLE R, YU X. Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. **Journal of Medical Microbiology**, 52:1021-1026, 2003.

ZHANG JZ, SINHA M, LUXON BA, YU XJ. Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: a novel modulation of immune response and host cell cycles. **Infect. Immun.** 72:498-507, 2004.

ZHANG, J. Z., POPOV, V. L., GAO, S., WALKER, D. H. & YU, X. J. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cell. Microbiol.** 9, 610–618, 2007.

ZHU B, et al. Nuclear translocated *Ehrlichia chaffeensis* ankyrin protein interacts with the mid Astretch of host promoter and intronic Alu elements. **Infect Immun**, 77:4243–4255, 2009.





**Apêndice 1:** Instrução normativa interministerial

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO GABINETE  
DO MINISTRO**

**INSTRUÇÃO NORMATIVA INTERMINISTERIAL Nº 32, DE 16 DE AGOSTO DE  
2013**

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
GABINETE DO MINISTRO**

DOU de 19/08/2013 (nº 159, Seção 1, pág. 5)

OS MINISTROS DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO E DA PESCA E AQUICULTURA, no uso da atribuição que lhes conferem o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto na Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, na Lei nº 11.958, de 29 de junho de 2009, no Decreto nº 7.024, de 7 de dezembro de 2009, no Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, no Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, no Decreto nº 6.296, de 11 de dezembro de 2007, no Decreto nº 6.759, de 5 de fevereiro de 2009, no Decreto nº 6.972, de 29 de setembro de 2009, no Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, na Instrução Normativa Mapa nº 36, de 10 de novembro de 2006, na Instrução Normativa Mapa nº 40, de 30 de junho de 2008, na Portaria Mapa nº 428, de 9 de junho de 2010, na Instrução Normativa MPA nº 3, de abril de 2012, e o que consta dos Processos nº 21000.000789/2009-15 e 21000.011461/2011-49, resolvem:

Art. 1º - Estabelecer o regulamento sanitário para importação de materiais de origem animal e agentes de interesse veterinário destinados à pesquisa ou diagnóstico pelos laboratórios constitutivos da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), pela Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura (Renaqua) e por Instituições de pesquisa ou diagnóstico.

Parágrafo único - Para fins do regulamento previsto no *caput*, ficam aprovados os modelos anexos a esta Instrução Normativa Interministerial na forma seguinte:

I - Anexo I: declaração de origem para envio ao Brasil de material classificado como de risco sanitário insignificante;

II - Anexo II: requerimento para solicitação de cadastramento de instituição para importação de material classificado como de risco sanitário insignificante;

III - Anexo III: certificado de origem para envio ao Brasil de material classificado como de risco sanitário significativo e destinado à pesquisa ou diagnóstico; e

IV - Anexo IV: declaração de origem para envio ao Brasil de material de risco sanitário insignificante destinado a laboratório da rede nacional de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil ou do Ministério da Pesca e Aquicultura.

Art. 2º - Os materiais de origem animal e agentes de interesse veterinário de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa Interministerial serão classificados em:

I - material de risco sanitário insignificante; ou

II - material de risco sanitário significativo.

## CAPÍTULO I

### DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 3º - Para efeito desta Instrução Normativa Interministerial, consideram-se:

I - material de origem animal: todas as partes ou derivados oriundos de animais (vertebrados e invertebrados);

II - agentes de interesse veterinário e suas partes: príons, fungos, bactérias, vírus, parasitos e seus derivados; e

III - agentes de interesse veterinário inativados: príons, fungos, bactérias, vírus, parasitos e seus derivados submetidos a processo físico-químico cuja eficácia seja suficiente para inviabilizar a sua propagação, o seu metabolismo e a sua capacidade de causar quaisquer efeitos adversos em outros organismos vivos;

IV - instituições de pesquisa ou diagnóstico: entidades públicas ou privadas que desenvolvem ou transferem conhecimento científico e tecnológico ou que realizam análises laboratoriais na área de diagnóstico em sanidade animal.

Art. 4º - Para a importação de mercadorias relacionadas nesta Instrução Normativa Interministerial que contenham Organismos Geneticamente Modificados - OGM, o interessado deverá obter autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNbio, conforme o disposto no inciso IX do art. 14 da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005.

## CAPÍTULO II

### IMPORTAÇÃO DE MATERIAL DE RISCO SANITÁRIO INSIGNIFICANTE

Art. 5º - São classificados como de risco sanitário insignificante os seguintes materiais de origem animal e agentes de interesse veterinário:

I - materiais biológicos de origem animal, conservados ou fixados, em alguma etapa de seu processamento, em formaldeído em concentração mínima de 10% (dez por cento), em álcool em concentração mínima de 70% (setenta por cento) ou em glutaraldeído em concentração mínima de 2% (dois por cento);

II - ácidos nucleicos, sintéticos ou naturais, não obtidos de organismos geneticamente modificados ou por processos de recombinação, purificados, procedentes de animais e agentes

de interesse veterinário, sem atividade biológica, atóxicos e não inoculados em animais ou em agentes de interesse veterinário;

III - lâminas de cortes histológicos e blocos de parafina com material para corte histológico;

IV - meios de cultura e seus ingredientes para utilização em laboratório, sem hemoderivados e materiais originados de ruminantes em sua composição, à exceção daqueles considerados, de acordo com a legislação vigente, isentos de risco para Encefalopatia Espongiforme Bovina - EEB;

V - antígenos, anticorpos e outros peptídeos e proteínas purificadas de animais;

VI - enzimas e demais proteínas purificadas de origem microbiana; e

VII - agentes de interesse veterinário inativados.

Art. 6º - A importação de materiais classificados como de risco sanitário insignificante de que trata esta Instrução Normativa Interministerial fica isenta de autorização prévia de importação e da apresentação de certificado sanitário internacional assinado por autoridade oficial do país exportador.

§ 1º - Para isenção disposta no *caput* deste artigo, é necessário que:

I - o importador declare que a mercadoria destina-se exclusivamente à pesquisa ou diagnóstico laboratorial e que estará sob sua responsabilidade;

II - o importador esteja cadastrado na Divisão de Defesa Agropecuária da Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - DDA/SFA de destino do material importado, seja pessoa jurídica ou pessoa física vinculada à instituição de pesquisa ou diagnóstico;

III - a chegada do material seja comunicada à Unidade ou ao Serviço de Vigilância Agropecuária Internacional do ponto de entrada do material no País com antecedência mínima de 48 (quarenta e oito) horas;

IV - os materiais importados estejam acompanhados de declaração de origem, na qual um dos idiomas seja o português, assinada por profissional responsável pela instituição de procedência do material, na qual constarão as mesmas informações do Anexo I da presente Instrução Normativa Interministerial.

§ 2º - A DDA da SFA da unidade federativa de destino da mercadoria deverá cadastrar a instituição importadora conforme modelo de formulário apresentado no Anexo II da presente Instrução Normativa Interministerial e encaminhar ao Departamento de Saúde Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - DSA/SDA/Mapa as informações do cadastro completo.

§ 3º - Poderá ser cadastrado mais de um profissional por instituição, em conformidade com o Anexo II da presente Instrução Normativa Interministerial, que deve ocupar cargo que lhe atribua a prerrogativa de responder em nome da unidade laboratorial ou de pesquisa.

§ 4º - Somente após o recebimento completo das informações listadas no Anexo II da presente Instrução Normativa Interministerial, o DSA/SDA/Mapa disponibilizará o nome da instituição cadastrada, no endereço eletrônico do Mapa para consulta dos Fiscais Federais Agropecuários das Unidades do Sistema Vigiagro responsáveis pelos procedimentos de fiscalização dos materiais nos pontos de ingresso do País.

§ 5º - As instituições cadastradas ficarão sob supervisão da SFA responsável pelo cadastramento, devendo manter atualizadas as informações referentes ao seu cadastro.

§ 6º - Qualquer alteração nas informações cadastrais da instituição importadora deverá ser imediatamente comunicada à SFA responsável pelo cadastramento.

§ 7º - O cancelamento do cadastro de instituições poderá ocorrer, observado o contraditório e a ampla defesa, nas seguintes situações:

I - a pedido da instituição cadastrada;

II - quando o disposto nesta Instrução Normativa Interministerial ou na legislação sanitária vigente for infringido pela instituição.

§ 8º - Nos casos de cancelamento de cadastro de instituições, a importação de materiais de origem animal classificados como de risco sanitário insignificante será realizada mediante emissão de autorização prévia de importação.

Art. 7º - São classificados como de risco sanitário insignificante quando destinados à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários ou à Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura os seguintes materiais:

I - padrões analíticos de fármaco ou substância ativa de produtos veterinários, metais e de demais substâncias orgânicas e inorgânicas não consideradas toxinas e agrotóxicos e afins cuja quantidade por substância não ultrapasse a 100 (cem) gramas;

II - padrões analíticos de agrotóxicos e afins cuja quantidade por substância não ultrapasse a 20 (vinte) gramas;

III - reagentes e solventes;

IV - materiais de referência certificados, exceto agentes de interesse veterinário classificados como de risco sanitário significativo;

V - amostras de ensaio de proficiência, exceto agentes de interesse veterinário classificados como de risco sanitário significativo; e

VI - amostras de material de origem animal, exceto aquelas classificadas como de risco sanitário significativo.

Art. 8º - Os materiais classificados como de risco sanitário insignificante e destinados à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários ou à Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura estão isentos de autorização prévia de importação e da apresentação de

certificado sanitário internacional assinado por autoridade oficial do país exportador, desde que cumpram os seguintes requisitos:

I - a finalidade for exclusivamente a utilização na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários ou na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura;

II - o importador, ou seu representante legal, comunicar, com antecedência mínima de 48 (quarenta e oito) horas, a chegada do material à Unidade ou ao Serviço de Vigilância Agropecuária Internacional do ponto de entrada do material no País; e

III - estejam acompanhados de declaração de origem, na qual um dos idiomas seja o português, assinado por profissional responsável pela instituição de origem do material, no qual constem as informações presentes no modelo de declaração de origem, conforme Anexo IV da presente Instrução Normativa Interministerial.

### CAPÍTULO III

#### IMPORTAÇÃO DE MATERIAL DE RISCO SANITÁRIO SIGNIFICANTE

Art. 9º - São classificados como de risco sanitário significativo os seguintes materiais de origem animal e agentes de interesse veterinário:

I - materiais biológicos de origem animal, não conservados ou fixados, em alguma etapa de seu processamento, em formaldeído em concentração mínima de 10% (dez por cento), em álcool em concentração mínima de 70% (setenta por cento) ou em glutaraldeído em concentração mínima de 2% (dois por cento);

II - ácidos nucleicos não purificados ou recombinantes ou com atividade biológica ou tóxicos ou inoculados em animais ou em agentes de interesse veterinário;

III - antígenos, anticorpos e outros peptídeos e proteínas não purificadas de animais;

IV - enzimas e outras proteínas não purificadas de origem microbiana;

V - agentes de interesse veterinário não inativados;

VI - plasmídeos e fagos; e

VII - linhagens de células e de tecidos de animais.

Art. 10 - Para a importação de material classificado como de risco sanitário significativo, é necessária a obtenção de autorização prévia de importação de acordo com a legislação vigente.

§ 1º - Caberá ao importador a comprovação de cadastro de pessoa jurídica ou pesquisador credenciado (pessoa física) pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq na Divisão de Defesa Agropecuária da SFA ou na Superintendência Federal de Pesca e Aquicultura - SFFPA do local de destino, conforme atribuições.

§ 2º - Quando a finalidade da importação for experimentação ou pesquisa científica e tecnológica, o importador ou seu representante legal deverá apresentar resumo do projeto de pesquisa que especifique a utilização e destinação do material importado, além de protocolo de inativação, destruição e disposição do material importado e seus resíduos.

§ 3º - Quando a finalidade da importação for diagnóstico, o importador ou seu representante legal deverá apresentar protocolo ou fluxograma laboratorial que especifique a utilização e destinação do material importado, além de protocolo de inativação, destruição e disposição do material importado e seus resíduos.

§ 4º - Os protocolos de inativação, destruição e disposição do material importado deverão ser assinados pelo profissional responsável e poderão se valer dos seguintes métodos:

I - incineração em estabelecimento devidamente credenciado nos termos da legislação ambiental vigente;

II - autoclavagem; ou

III - outro método aprovado pela Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA/Mapa ou Secretaria de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura - Semoc/MPA.

§ 5º - Deverá constar, na autorização de importação, referência aos requisitos sanitários específicos, quando existentes.

§ 6º - Para os materiais derivados de ruminantes, à exceção daqueles considerados isentos de risco para Encefalopatia Espongiforme Bovina - EEB de acordo com a legislação vigente, as autorizações de importação ficarão condicionadas à emissão de documento do importador, declarando que a mercadoria não será utilizada para consumo ou inoculação em animal, será destinada exclusivamente à utilização *in vitro* e será inativada e destruída previamente ao descarte, sem prejuízo das demais exigências contidas nesta Instrução Normativa Interministerial e naquelas específicas para EEB.

Art. 11 - Para obtenção da autorização de importação de agentes de interesse veterinário classificados como de risco sanitário significativo, o importador deverá encaminhar ao Mapa ou MPA, conforme atribuições, termo de responsabilidade quanto à segurança, conservação, utilização e destruição do material a ser importado, endossado pelo responsável pela instituição de destino.

Parágrafo único - O termo de responsabilidade deverá igualmente vir acompanhado de protocolo de inativação, destruição e disposição.

Art. 12 - O nível de contenção biológica do laboratório ou unidade operativa de destino deve cumprir os padrões vigentes para manipulação do agente de interesse veterinário em questão.

Parágrafo único - Membros da Comissão de Biossegurança da SDA/Mapa ou outros técnicos do Mapa ou MPA poderão vistoriar, conforme competência, as instalações do estabelecimento de destino dos agentes de interesse veterinário para verificar as condições de biossegurança; a

vistoria poderá ser realizada com a participação de consultores *ad hoc*, especialistas da área de interesse.

Art. 13 - Não haverá exigência zoossanitária específica para importação das mercadorias relacionadas abaixo:

I - plasmídeos e fagos incapazes de transformar agentes de interesse veterinário em agentes patogênicos destinados à manipulação exclusiva *in vitro*;

II - urina, sangue e seus derivados (à exceção de soro fetal), líquido cefalorraquidiano e sinovial, albumina, líquido de efusões ou derrames cavitários, tecidos neoplásicos e fragmentos teciduais para citologia, histologia ou histopatologia, humor aquoso ou vítreo, fezes e demais excreções e secreções biológicas (à exceção de sêmen), quando originados de animais e para uso exclusivo em diagnóstico, experimentação ou pesquisa científica e tecnológica *in vitro*; e

III - linhagens de células e tecidos de animais, não patogênicos aos animais ou aos homens, para manipulação *in vitro*, que não possuam soro fetal bovino ou quaisquer outros fatores de crescimento de origem animal e que sejam livres de contaminantes, e agentes de interesse veterinário.

§ 1º - Nos casos de que trata o presente artigo, a importação poderá ser realizada mediante o cumprimento das exigências descritas nos arts. 9º ao 18 e a apresentação de certificado em conformidade com o modelo que consta no Anexo III da presente Instrução Normativa Interministerial.

§ 2º - Para os casos de importação de outras mercadorias, deverão ser atendidos os requisitos zoossanitários específicos a serem definidos pelo Mapa e MPA.

Art. 14 - Para a importação de enzimas de origem animal, deverão ser atendidas as mesmas exigências sanitárias referentes à importação de produtos das espécies que as originaram, considerando a possibilidade de inativação de agentes de interesse veterinário pelo processo de obtenção destes produtos.

Art. 15 - Para fins do transporte dos materiais especificados no art. 9º, deverão ser obedecidas as recomendações internacionalmente reconhecidas.

Art. 16 - As mercadorias importadas e destruídas por determinação do Mapa ou MPA devem ter seus termos de destruição encaminhados, pela instituição responsável, à SFA ou SFPA, da unidade federativa de sua jurisdição, imediatamente após o término de sua utilização.

Art. 17 - Para ingresso em território nacional, os materiais especificados no art. 9º desta Instrução Normativa Interministerial deverão estar acompanhados de Certificado Sanitário Internacional ou Certificado de Origem expedido ou endossado por órgão oficial do país de origem ou procedência, no qual deverão constar as informações descritas no modelo aprovado na forma do Anexo III da presente Instrução Normativa Interministerial, além daquelas exigidas na autorização de importação, quando aplicáveis.

Art. 18 - As importações de que trata a presente Instrução Normativa Interministerial estarão sujeitas à análise pelo DSA/SDA/Mapa ou Democ/Semoc/MPA, conforme competência, quando o material:

I - contiver agentes de interesse veterinário causadores de doenças exóticas ou de controle oficial;

II - for procedente de espécie animal inoculada com agentes de doenças exóticas ou de controle oficial;

III - for obtido de animal acometido ou suspeito de estar acometido por doenças exóticas ou de controle oficial;

IV - for considerado como possível veiculador de agentes de doenças exóticas ou de controle oficial e for procedente de países considerados infectados por estas doenças.

Parágrafo único - Os materiais de que trata este artigo somente poderão ser retirados da instituição de destino, sem inativação total, mediante aprovação do DSA/SDA/Mapa ou Departamento de Monitoramento e Controle - Democ/Semoc/MPA, conforme competência.

#### CAPÍTULO IV

##### DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 19 - Para a importação de materiais de origem animal e agentes de interesse veterinário não classificados como de risco sanitário insignificante ou significativo nos termos desta instrução normativa interministerial, o importador deverá apresentar à SFA ou SFPA da unidade federativa de destino do material a solicitação de autorização de importação para encaminhamento e avaliação técnica pelo DSA/SDA ou Democ/Semoc, respectivamente.

§ 1º - Para classificação de um material como de risco sanitário insignificante ou significativo, a SDA/Mapa e Semoc/MPA utilizarão como critérios:

I - composição;

II - processamento; e

III - finalidade de uso e destinação final.

§ 2º - Será igualmente avaliada a possibilidade de introdução, no território nacional, de agentes causadores de enfermidades que impactem negativamente sobre a condição sanitária do País, sobre a saúde pública, a sustentabilidade das cadeias produtivas de produção animal, considerando a chance de estabelecimento e disseminação de doenças, as prováveis perdas econômicas e os custos de controle e erradicação no território nacional.

§ 3º - Caso o material seja classificado como de risco sanitário insignificante, deverão ser observados os procedimentos administrativos descritos nos arts. 5º ao 8º para a importação da mercadoria.



§ 4º - Caso o material seja classificado como de risco sanitário significativo, deverão ser observados os procedimentos administrativos descritos nos arts. 9º ao 18º para a importação da mercadoria.

Art. 20 - As dúvidas suscitadas na aplicação desta Instrução Normativa Interministerial serão resolvidas pelo Mapa e MPA.

Art. 21 - Em casos de indícios de descumprimento ou de dúvidas quanto à identidade, à quantidade, ao destino ou ao uso proposto dos produtos importados, a autoridade competente poderá suspender a autorização de importação e tomar outras medidas administrativas conforme legislação pertinente. Parágrafo único. A aplicação indevida do protocolo de destruição, inativação e disposição ensejará igualmente as mesmas medidas previstas no caput deste artigo.



Art. 22 - O disposto nesta Instrução Normativa Interministerial não exime o importador, bem como os materiais a serem importados, do cumprimento de outras exigências estabelecidas na legislação vigente conforme a modalidade de transporte adotada e o regime aduaneiro aplicado.

Art. 23 - Esta Instrução Normativa Interministerial entra em vigor na data da sua publicação.

Art. 24 - Fica revogada a Instrução Normativa Mapa nº 14, de 20 de junho de 2006.

ANTÔNIO ANDRADE - Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento


MARCELO CRIVELLA - Ministro de Estado da Pesca e Aquicultura

**Anexo 1: Autorização do Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (CEPA)**

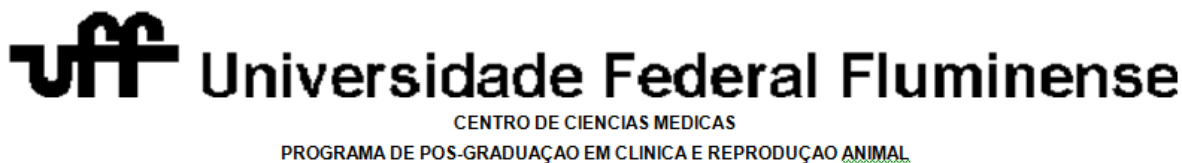
Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pro-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 759, intitulado “Detecção molecular de *Ehrlichia spp.*, *Rickettsia rickettsii* e *Borrelia burgdorferi* em cães da cidade de Piura - Peru”, sob a orientação da Prof. Dr. Nádia Regina Pereira Almosny da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 28 de Abril de 2016. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 281 (duzentos e oitenta e um) cães, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 28 de Abril de 2016.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli  
Coordenador da CEUA

**Anexo 2:** Termo Consentimento Livre e Esclarecido



**TERMO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
portador do Documento Nacional de Identidade N° \_\_\_\_\_, residente  
à \_\_\_\_\_, proprietário/responsável pelo animal  
\_\_\_\_\_, espécie \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_  
, autorizo ao Médico Veterinário Luis Fernando Cerro Temoche (CMVP 6235), aluno  
doutorando do Programa de Pós-Graduação em Clínica e Reprodução Animal da  
Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro – Brasil a utilizar o animal como sujeito de  
pesquisa para fins didáticos e científicos.

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Rickettsia rickettsii* e *Borrelia burgdorferi* em cães da cidade de Piura - Peru

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Msc Mv Luis Fernando Cerro Temoche

Colegio Médico Veterinário Perú (CMVP): 6235

Após esclarecimentos prévios, estou ciente da participação do animal na coleta de material biológico, assim como a utilização de resultados de pesquisa obtidos pelo estudo no animal em publicação de artigos científicos e divulgação em eventos científicos. Para fins de publicações e apresentações científicas, a identidade do proprietário ser preservada.

Afirmo que a qualquer momento poderei suspender a participação do animal na pesquisa e que caso isso ocorra, o animal não sofrerá prejuízos em seu tratamento. Estou ciente que não serei gratificado monetariamente e que não receberei qualquer outro benefício pela participação na pesquisa.

Poderei receber maiores informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também poderei esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Fui informado dos riscos da utilização do animal para fins didáticos e/ou científicos e estou ciente que na ocorrência de danos decorridos durante o **procedimento de colheita de**

**material biológico**, o animal poderá ser atendido gratuitamente pelo profissional encarregado da pesquisa.

Concordo em seguir corretamente todas as recomendações do profissional durante e após a utilização do animal e, caso haja qualquer dano ao animal referente ao **não cumprimento dessas recomendações**, não responsabilizarei o médico veterinário pelo evento.

INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO: **PESQUISA**

INDICAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

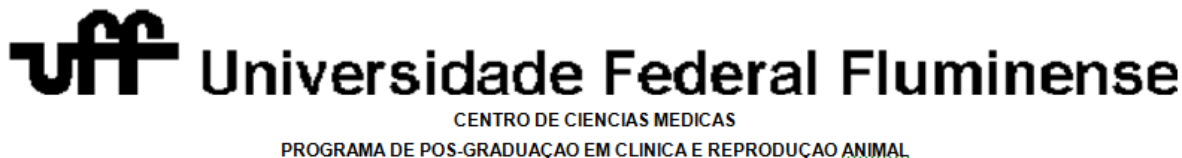
<b>SANGUE</b>	<b>ID:</b>
<b>FEZES</b>	<b>ID:</b>
<b>PELE</b>	<b>ID:</b>
<b>PELOS</b>	<b>ID:</b>
<b>OUTROS</b>	<b>ID:</b>

Data:

---

Proprietário

(assinatura)

**Anexo 3:** Ficha de identificação dos animais**TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

Deteção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa (Rickettsiales: Anaplasmataceae) e agentes da *Ordem Piroplasmida* em cães (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) da região metropolitana da Província de Piura, Piura-Peru.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Msc Mv Luis Fernando Cerro Temoche Colegio Médico Veterinário Perú (CMVP): 6235

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**DADOS DO ANIMAL**

NÚMERO DO ANIMAL: \_\_\_\_/\_\_\_\_

REGIÃO:

SEXO: ( ) F ( ) M

RAÇA:

PELAGEM – COR: \_\_\_\_\_

CONVIVE: GATOS? ( ) S ( ) N Qtos? \_\_\_\_\_

CÃES? ( ) S ( ) N Qtos? \_\_\_\_\_

OUTROS? ( ) S ( ) N Quais? \_\_\_\_\_

JÁ USOU ANTIBIÓTICO: QUAL? \_\_\_\_\_ QUANDO? \_\_\_\_\_ ( ) N ( ) não sabe

**COLETA DE MATERIAL**

Sangue: ( ) S ( ) N

Carrapatos: ( ) S ( ) N

**RESULTADOS**

*Familia Anaplasmatacea:* ( ) Positivo ( ) Negativo

*Ehrlichia chaffeensi:* ( ) Positivo ( ) Negativo

*Ehrlichia canis:* ( ) Positivo ( ) Negativo

*Anaplasma platys:* ( ) Positivo ( ) Negativo

*Ordem Piroplasmida :* ( ) Positivo ( ) Negativo

*Rickettsia rickettsii :* ( ) Positivo ( ) Negativo