



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

**FERNANDA DE TOLEDO VIEIRA**

**"OCORRÊNCIA DE *EHRlichia spp.*, *ANAPLASMA spp.*,  
*BABESIA spp.*, *HEPATOZOON spp.* E *RICKETTSIA spp.* EM  
CÃES DOMICILIADOS EM SEIS MUNICÍPIOS DO ESTADO  
DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL"**

**Vitória – ES  
2017**

**FERNANDA DE TOLEDO VIEIRA**

**"OCORRÊNCIA DE *EHRlichia spp.*, *ANAPLASMA spp.*,  
*BABESIA spp.*, *HEPATOZOON spp.* E *RICKETTSIA spp.* EM  
CÃES DOMICILIADOS EM SEIS MUNICÍPIOS DO ESTADO  
DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL"**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
graduação em Doenças Infecciosas da  
Universidade Federal do Espírito Santo para a  
obtenção do título de Doutor em Doenças  
Infecciosas.

**Orientador:** Prof. Dr. Reynaldo Dietze

**Vitória – ES  
2017**



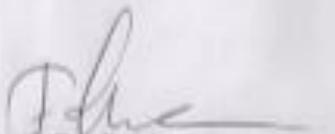
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

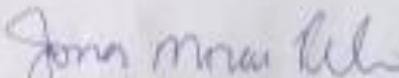
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

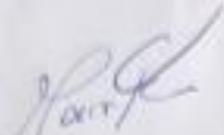
A doutoranda FERNANDA DE TOLEDO VIEIRA apresentou a tese intitulada "OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Hepatozoon spp.* e *Rickettsia spp.* EM CÃES DOMICILIADOS EM SEIS MUNICÍPIOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

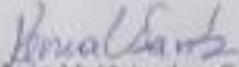
Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu ( X ) **aprovar** ( ) **reprovar** a tese habilitando a Mestre em Medicina Veterinária a obter o Grau de DOUTOR EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

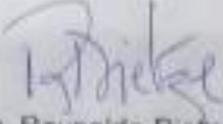
Vitória, ES, 20 de julho de 2017.

  
Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Jonas Moraes Filho  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Moises Palaci  
(Membro Interno)

  
Prof. Dr. Kênia Valéria dos Santos  
(Membro Interno)

  
Prof. Dr. Reynaldo Dietze  
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus familiares, que me apoiaram e incentivaram a desenvolvê-lo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, coragem e determinação para o desenvolvimento deste trabalho, mesmo diante de tantas dificuldades e imprevistos que aconteceram ao longo da caminhada. Alguns imprevistos que pensava em não conseguir resolver, dores que pensava não conseguir suportar. Mas o Senhor me mostrou estar ao meu lado e me tornou forte o suficiente para enfrentar e vencer todas as dificuldades. Obrigada por me amar infinitamente!

À minha família que me apoiou e compreendeu momentos de ausência, principalmente meus filhos e esposo.

Agradeço a todos que me ajudaram a cuidar de Maria Clara (minha mãe, minha sogra e a Yara) para as minhas viagens a São Paulo para o desenvolvimento do experimento se tornassem possíveis.

Agradeço a Yara e a Shirley que me ajudaram a cuidar de Miguel e de Maria Clara para que eu pudesse escrever a Tese.

Agradeço a todas as bancas de revista próximas a USP que proporcionaram indiretamente momentos de alegria a Maria Clara em todos os retornos a nossa casa, quando eu chegava com revistinhas para colorir, gibis e álbuns de figurinhas. Estes eram os reforços positivos semanais para que se comportasse bem durante a semana na ausência da mamãe.

Agradeço as amigas das repúblicas que me acolheram durante algumas semanas durante dois anos em São Paulo. Julia, Tatiana e Fernanda, a casa de vocês foi primordial para minha estadia em São Paulo para o processamento de minhas amostras.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos do programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da USP por todo apoio. Em especial aos pós-graduandos Igor (meu querido ex-aluno), Tiago, Jonas, Felipe, Chico, Andrea, Tatiana, Julia, Gislene, Marcos Piauí, Herbert, João, Amália e Fernanda.

Aos meus alunos, estagiários e bolsistas de iniciação científica que me ajudaram nas coletas, em especial a Anna Claudia Mombrini.

Agradeço também a todos os meus alunos que aceitaram trocas de aulas e horários para que minhas viagens a São Paulo fossem possíveis. Fizemos muitas antecipações, inversões e reposições de aulas. Inclusive aos sábados. Queridos alunos, a assinatura de vocês concordando com todas as alterações de nossas aulas foram fundamentais para que tudo isto fosse possível.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente você estará fazendo o impossível.”  
São Francisco de Assis

## RESUMO

**VIEIRA, F.T. "Ocorrência de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp. Em cães domiciliados em seis municípios do Estado do Espírito Santo, Brasil"** [Occurrence of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs domiciled in six municipalities of the State of Espírito Santo, Brazil]2017. Xf. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

Doenças transmitidas por carrapatos representam importante causa de morbidade e mortalidade em cães (*Canis lupus familiaris*) em todo o mundo, tendo o *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) como vetor de vários agentes. É muito importante conhecer a prevalência destas doenças, seus vetores e hospedeiros com o objetivo de controlar e preveni-las em determinada região. Doenças transmitidas por carrapatos apresentam importância tanto para a Medicina Veterinária quanto para a Saúde Pública. Este trabalho tem como objetivo identificar e quantificar o percentual de infecção para *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães domiciliados e identificar os carrapatos coletados nestes animais nos municípios de Santa Teresa, Colatina, Alegre, Vila Velha, Vitória e Serra. Participaram deste estudo 378 cães, 226 fêmeas e 152 machos, de diversas raças e idades (média de 4,1 anos) com ectoparasitismo (carrapatos) ou histórico de parasitismo recente (até 30 dias). Dos 378 cães examinados, 157 (41,53%) apresentavam carrapatos no momento da consulta os quais foram identificados como *R. sanguineus* s.l. em 154 animais (98,1%), *Amblyomma ovale* em um animal (0,63%) e *Amblyomma sculptum* em 2 animais (1,27%). Todos os animais examinados tiveram sangue total coletados para a realização de exames moleculares: PCR Real Time para *Ehrlichia canis*, PCR para *Babesia* spp., PCR para *Hepatozoon* spp. e PCR para Anaplasmataceae. No PCR Real Time específica para *E. canis*, 28 animais (7,4%) foram positivos. Para Anaplasmataceae, 34 animais (9%) foram positivos, dos quais 10 geraram sequências de DNA com 100% de similaridade com *Ehrlichia canis* e as outras 24 amostras geraram um fragmento com 100% de similaridade com *Anaplasma platys*. No PCR para *Babesia* spp., 5 animais (1,3%) foram positivos, gerando sequências de DNA 100% idênticas com *Babesia vogeli*. Por fim, 39 animais (10,31%) foram positivos na PCR para *Hepatozoon* spp., gerando sequências 100% idênticas a *Hepatozoon canis*. Observou-se co-infecção com 2 ou 3 agentes em 22 animais (5,8%). Dos 378 cães do estudo, 312 tiveram amostras de soro sanguíneo coletados para a realização de exames sorológicos: reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *E. canis*, com reação positiva em 71 animais (22,75%) e para cinco espécies de *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatidis*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*). Dos soros analisados por RIFI, 16 animais (5,13%) apresentaram títulos  $\geq 64$  para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* das cinco testadas, sendo que 5 (1,6%) destes apresentaram títulos  $\geq 64$  para *R. rickettsii*. Estes resultados indicam que alguns dos municípios estudados apresentam agentes transmitidos por carrapatos circulando na população canina, tais como *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli*, *H. canis*, e possivelmente *Rickettsia* sp. do grupo da febre maculosa.

**Palavras-chave:** cães, carrapatos, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*.

## ABSTRACT

**VIEIRA, F.T. "Ocorrência de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp. Em cães domiciliados em seis municípios do Estado do Espírito Santo, Brasil"** [Occurrence of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs domiciled in six municipalities of the State of Espírito Santo, Brazil]2017. Xf. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2017.

Tick-borne diseases are an important cause of morbidity and mortality in dogs (*Canis lupus familiaris*) worldwide, with the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) as a vector of various agents. It is very important to know the prevalence of these diseases, their vectors and hosts in order to control and prevent them in the given region. Tick-borne diseases have importance for both veterinary medicine and for public health. This work aims to identify and quantify the percentage of infection by *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in pet dogs and identify ticks collected on these animals in the municipalities of Santa Teresa, Colatina, Alegre, Vila Velha, Vitória and Serra. The study included 378 dogs, 226 females and 152 males, of various breeds and ages (mean 4.1 years) with ectoparasites (ticks) or parasitism recent history (30 days). Of the 378 dogs examined, 157 (41.53%) had ticks at the time of consultation, which were identified as *R. sanguineus* s.l. in 154 animals (98.1%), *Amblyomma ovale* in one animal (0.63%) and *Amblyomma sculptum* in 2 animals (1.27%). All animals were examined and whole blood were collected and processed by molecular tests: Real Time PCR for *Ehrlichia canis*, and conventional PCR protocols for *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., and for Anaplasmataceae. In the Real Time PCR specific for *E. canis*, 28 animals (7.4%) were positive. For Anaplasmataceae, 34 animals (9%) were positive, of which 10 generate DNA sequences with 100% similarity with *Ehrlichia canis* and the other 24 samples generated fragments 100% identical to *Anaplasma platys*. In the PCR for *Babesia* spp., 5 animals (1.3%) were positive, producing DNA sequences 100% identical to *Babesia vogeli*. Finally, 39 animals (10.31%) were positive by PCR for *Hepatozoon* spp., producing sequences 100% identical to *Hepatozoon canis*. It was observed coinfection with 2 or 3 agents in 22 animals (5.8%). Of the 378 dogs in the study, 312 had serum samples collected for serological tests: indirect immunofluorescence assay (IFA) for *E. canis*, with positive reaction in 71 animals (22,75%) and five species of *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*). Among the sera analyzed by IFA, 16 animals (5.13%) had titers  $\geq 64$  for at least one species of *Rickettsia* of the five tested, and 5 (1.6%) of those had titers  $\geq 64$  for *R. rickettsii*. These results indicate that some of the studied municipalities have agents transmitted by ticks circulating in the canine population, such as *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli*, *H. canis*, and possibly spotted fever group rickettsiae.

**Key-words:** dogs, ticks, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l, vista dorsal. 5,6x, SZX7 Stereo Microscopes – Olympus .....	41
Figura 2. Imagem do carrapato <i>Amblyomma ovale</i> , vista dorsal. 5,6 x, SZX7 Stereo Microscopes – Olympus .....	41
Figura 3. Imagem do carrapato <i>Amblyomma sculptum</i> , vista dorsal. 5,6 x, SZX7 Stereo Microscopes – Olympus .....	42
Figura 4. Imunofluorescência indireta (RIFI) de <i>Ehrlichia canis</i> no soro de um cão infectado (400 X).....	44
Figura 5. Imunofluorescência indireta (RIFI) de <i>Rickettsia</i> sp. no soro de um cão infectado (400 X).....	44
Figura 6. Mapa com a distribuição dos animais (cães e equinos) positivos para pelo menos um dos agentes testados.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de todos os <i>primers</i> utilizados na elaboração do projeto.....	35
Tabela 2. Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de sangue de cães de 6 municípios do Estado do ES, Brasil .....	45
Tabela 3. Resultados dos sequenciamentos das amostras positivas na PCR.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Mg – Microgramas  
µl – Microlitros  
DNA – Deoxyribonucleic acid – ácido dextribonucleico  
dNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfatado  
EDTA – Ácido etilodiaminotetracético  
FMB – Febre Maculosa Brasileira  
g – Gramas  
g – Força da gravidade  
HCl – Ácido clorídrico  
KCl – Cloreto de potássio  
Kg – Quilogramas  
mg – Miligramas  
Mg – Magnésio  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio  
ml – Mililitro  
mM – Milimolar  
ng – Nanograma  
pb – Pares de Bases  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PBS- Tampão Fosfato Salina  
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase  
TE – Tris EDTA  
Tris – Tris (hydroxymethyl) aminomethane  
U – Unidade  
UFES- Universidade Federal do Espírito Santo  
UNESC – Centro Univesitário do Espírito Santo  
ESFA- Escola Superior São Francisco de Assis  
UV – Ultravioleta  
UVV – Universidade Vila Velha

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

® – Marca registrada

X – Vezes

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Carrapatos.....	19
3.2. <i>Rickettsia</i> spp.....	21
3.2.1. <i>Rickettsias</i> do Grupo da Febre Maculosa.....	22
3.3. Ehrliquiose e Anaplasmosose.....	25
3.4. Babesiose.....	28
3.5. Hepatozoonose.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Local de Coleta.....	31
4.2. Coleta e acondicionamento de espécimes de carrapatos.....	31
4.3. Identificação morfológica dos carrapatos.....	32
4.4. Extração de DNA dos carrapatos para posterior identificação de patógenos.....	32
4.5. Extração de DNA de amostras de sangue de cães infestados por carrapatos.....	32
4.6. Reação em Cadeia da polimerase (PCR).....	33
4.6.1. <i>Babesia</i> spp.....	33
4.6.2. Anaplasmataceae.....	33
4.6.3 <i>Hepatozoon</i> spp.....	34
4.6.4 <i>Rickettsia</i> spp.....	34
4.7. Leitura e análise dos produtos de PCR.....	35
4.8. PCR em tempo real para <i>Ehrlichia canis</i> .....	36
4.9. Sequenciamento.....	36
4.10. Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Rickettsia</i> spp.....	37
4.11. Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i> .....	38
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	39
6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1. Identificação dos Carrapatos.....	41
7.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	42
7.2.1. Municípios da Grande Vitória.....	42
7.2.2. Colatina.....	43
7.2.3. Santa Teresa.....	43
7.2.4. Alegre.....	43
7.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	44
7.3.1. RIFI para <i>Rickettsia</i> spp.....	45
7.3.2. RIFI para <i>Ehrlichia canis</i> .....	46
7.4. Reação em Cadeia da Polimerase dos Carrapatos.....	46
7.5. Sequenciamento.....	46
8. DISCUSSÃO.....	49
9. CONCLUSÃO.....	54
10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
11. REFERÊNCIAS.....	56



## 1. INTRODUÇÃO

Os cães possuem importante papel na sociedade como animais de companhia (DOTTI, 2005) o que favorece o íntimo contato com seus donos e conseqüentemente aumenta o risco de exposição a zoonoses. No Brasil, a convivência entre cães e o homem pode ser avaliada através de estimativas populacionais que no ano de 2013 indicaram a existência de 52,2 milhões de cães domiciliados no território nacional (média de 1,8 cães por domicílio), estando presentes em 28,9 milhões de residências o que corresponde a 44,3% dos domicílios do país (PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE, 2013).

As zoonoses associadas à cães domésticos são consideradas um problema de saúde pública e incluem doenças adquiridas ou por contato direto com saliva, fezes, urina, e secreções genitais dos animais (raiva, leptospirose, brucelose, larva migrans cutânea e visceral, pasteurelose, campilobacteriose, criptococose, criptosporidiose, dipilidíase, equinococose, febre Q, dermatofitose), ou por transmissão vetorial (leishmanioses, dirofilariose, febre maculosa, babesiose, ehrliquiose dentre outras) (GROVES, HARRINGTON e TABOADA, 2008; KOTTON, 2008). As três últimas são doenças transmitidas por carrapatos que se distinguem das demais pela possibilidade dos seus vetores poderem ser carreados pelos cães para o ambiente domiciliar.

Em cães, a infestação com ectoparasitos apresenta elevada prevalência podendo causar doenças não só nestes mas também em seus tutores (CASTRO e RAFAEL, 2006). Vários estudos no Brasil tem chamado a atenção para a elevada frequência de ectoparasitismo em cães domiciliados e errantes, com destaque para os carrapatos (TORRES, FIGUEIREDO e FAUSTINO, 2004; CASTRO e RAFAEL, 2006; RODRIGUES, DAEMON e RODRIGUES, 2008; STALLIVIERE et al., 2009). Durante a hematofagia, além de causarem lesões aos seus hospedeiros, podem transmitir agentes infecciosos aos animais e aos seus tutores, apresentando, portanto, importância também para a saúde pública (BARROS-BATTESTI, 2006).

É muito importante controlar a presença de carrapatos principalmente quando visamos à prevenção de doenças que são transmitidas por eles. As zoonoses associadas a cães domésticos são consideradas um problema de saúde pública e incluem várias doenças, dentre elas aquelas adquiridas por meio da picada do carrapato como a febre maculosa, babesiose e a ehrliquiose (GROVES, HARRINGTON e TABOADA, 2008; KOTTON, 2008).

Dentre os artrópodes hematófagos, os carrapatos apresentam maior potencial de transmissão de maior número de agentes patogênicos, via saliva. Podem transmitir patógenos como *Rickettsias* na ausência de hospedeiros vertebrados pelas vias transestadial e transovariana, o que os transformam em verdadeiros reservatórios de patógenos (BRITO et al., 2006).

Devido a íntima relação entre o homem e os cães, eventualmente alguns carrapatos de cães podem parasitar o homem levando não só ao desenvolvimento de lesões cutâneas, mas também de doenças infecciosas (DANTAS – TORRES, FIGUEIREDO e BRANDÃO – FILHO, 2006).

Estima-se que 75% das doenças infecciosas emergentes descobertas na natureza são zoonóticas (TAYLOR, LATHAM e WOOLHOUSE, 2001), o que sugere que estudos envolvendo animais, principalmente os de companhia, possam complementar estudos epidemiológicos humanos. Em organismos transmitidos por vetores, cães são utilizados como sentinela para estimar o risco de infecção de humanos. Da mesma forma, estudo de doenças em animais domésticos podem fornecer dados sobre incidência, fatores de risco e fonte de exposição antes da ocorrência de um surto da doença em humanos (DINIZ et al., 2007).

Assim como em outras regiões do Brasil, o censo de 2016 sobre a população canina da Região Metropolitana da Grande Vitória revelou um número expressivo de animais (631.869 cães) (Secretaria de Saúde-Vigilância Ambiental), o que representa 1 cão para cada 2,5 habitantes de acordo com dados do IBGE (BRASIL, 2010) cuja estimativa para a população humana nesta região foi de 1.594.234 de habitantes.

Doenças transmitidas por carrapatos apresentam importância tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana. A Febre Maculosa humana entre os anos de 2007 e 2015 teve notificação de 1143 casos no Brasil com 364 óbitos, a maioria deles da região sudeste (794 casos com 357 óbitos). Destes casos, 37 foram registrados no Estado do Espírito Santo com uma taxa de letalidade de 21,62%. Os casos registrados no estado do Espírito Santo, ocorreram em 11 municípios, dos quais três (Serra, Cariacica e Vila Velha) fazem parte da região metropolitana da Grande Vitória (BRASIL, 2017).

Observou-se em áreas rurais do norte do estado do Espírito Santo por positividade sorológica para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* e para *Ehrlichia canis* em cães e em humanos e positividade sorológica para *Babesia canis* e positividade em testes moleculares para Hepatozoonose em cães (Spolidorio et al., 2010; Spolidorio et al., 2009). Tais resultados sugerem que o ES pode ser considerado endêmico para Febre Maculosa, Ehrliquiose e Babesiose e Hepatozoonose canina. De acordo com Diniz et al. (2007), a elevada incidência

de Ehrliquiose canina em áreas urbanas no Sudeste do Brasil, indicam risco potencial da exposição humana por *Ehrlichia canis*.

Tem-se observado o aumento do risco a exposição de cães a doenças transmitidas por carrapatos em todo o mundo e devido ao fato da estreita relação destes patógenos com o ser humano, estes tem apresentado importância para a saúde pública (BEUGNET; MARIÉ, 2009).

Neste contexto, cães são considerados sentinelas para a determinação da prevalência da infecção de agentes transmitidos por carrapatos (DUCAN et al., 2004; DINIZ et al., 2007), além de servirem como carreadores de tais doenças para o ambiente domiciliar (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006). Os cães são susceptíveis a infecções por *Rickettsia rickettsii*, sendo considerados bons amplificadores da doença aumentando o risco da infecção em seres humanos que residem no mesmo ambiente, devido ao íntimo contato com os carrapatos infectados carreados por estes hospedeiros (PIRANDA et al., 2008). No Brasil, os principais patógenos transmitidos por carrapatos descritos em cães são *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* (referenciado anteriormente como *Mycoplasma haemocanis*) (SPOLIDORIO et al., 2011).

Não existem dados referentes à infecção de cães por agentes transmitidos por carrapatos na área urbana da Região Metropolitana da Grande Vitória – ES, bem como de outros municípios do Estado do Espírito Santo.

Tais fatos motivaram o desenvolvimento deste trabalho.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de infecção para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp. em cães domiciliados, além de identificar os carrapatos coletados nestes animais em seis municípios do ES.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Identificação de espécies de carrapatos capturados em cães domiciliados em seis municípios do ES;

- Avaliar a prevalência, através de técnicas moleculares, de infecções causadas por *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães domiciliados residentes de seis municípios do ES;

- Avaliar a prevalência, através de sorologia, de infecções causadas por *Rickettsia* spp. e *Ehrlichia* spp. em cães domiciliados parasitados por carrapatos em seis municípios do ES;

- Avaliar a prevalência, através de métodos sorológicos, a infecção causada por *Rickettsia* spp. em equinos residentes ou que transitam por regiões com presença de cães com sorologia positiva para este agente.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Carrapatos

Os carrapatos pertencem à ordem Acari, subordem Ixodida, sendo divididos em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Os ixodídeos, são parasitas de vertebrados em geral, mas se alimentam preferencialmente em mamíferos (OLIVER, 1989). Podem ser encontrados em vários ambientes nas fases não parasitárias. Seu ciclo compreende ovo, larva, ninfa e adulto com dimorfismo sexual. Cada estágio faz apenas uma alimentação, com repastos sanguíneos longos que compreendem vários dias (OLIVER, 1989). Entre as mudas (fases não parasitárias), podem ser encontrados em vários ambientes. Para cada estágio, ocorre uma alimentação que dura vários dias nos hospedeiros. As fêmeas se alimentam uma única vez, ingerindo grande quantidade de sangue que garante a produção de milhares de ovos, morrendo logo após a ovoposição que é única. Os machos em geral se alimentam intermitentemente (OLIVER, 1989).

Carrapatos possuem grande capacidade de agirem como vetores de doenças entre os animais e o homem por apresentarem hematofagismo em todas as fases evolutivas, fixação profunda nos hospedeiros, ingurgitamento lento, longevidade no ambiente, transmissão transovariana de alguns patógenos, grande adaptação no ambiente e grande potencial biótico (HARWOOD & JAMES, 1979). Além disto, possuem diversas substâncias em sua saliva com potencial imunoregulatório, que modula as atividades de citocinas nos hospedeiros (PETERKOVÁ et al., 2008), que favorecem a inoculação e transmissão de patógenos (RANDOLPH & CRAINE, 1995). Além disto, os carrapatos são capazes de permanecer por longos períodos (meses) no ambiente esperando no mesmo local por um hospedeiro, garantindo assim o foco de doenças por um maior tempo. Possuem grande longevidade, sendo importantes vetores e reservatórios de agentes infecciosos (LABUDA & NUTTAL, 2004).

Dentre os parasitas artrópodes de cães, o *R. sanguineus* s.l. (LATREILLE, 1806), comumente chamado de carrapato marrom do cão é considerado um eficiente vetor de um diversificado grupo de patógenos, e é provavelmente a espécie de ixodídeo mais amplamente distribuída no mundo (DANTAS-TORRES et al., 2012), sendo no Brasil introduzida durante a colonização. Nos anos 30, já estava distribuída em todo o Brasil (LABRUNA et al., 2001a; DANTAS-TORRES, 2008b).

O cão é seu hospedeiro preferencial, mas também podem ocasionalmente ser encontrados em outros animais como cavalos, bovinos e até mesmo em humanos (FERNANDES, 2000). Os cães são os hospedeiros de importância primária para a manutenção de uma população de *R. sanguineus* s.l. no ambiente. Isso significa que a presença desse ectoparasito está diretamente relacionada à presença de cães. O parasitismo do homem por esta espécie de carrapato é acidental e só ocorre em ambientes onde o carrapato se encontra, estando ausente o cão. Em cães, *R. sanguineus* s.l. causa desconforto, anemia e é vetor de diversos agentes tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Haemobartonella canis* (referenciado anteriormente como *Mycoplasma haemocanis*), *Hepatozoon canis*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma platys* (DANTAS-TORRES, 2008; ALMEIDA et al., 2012) e *Babesia canis vogeli* (DANTAS-TORRES, GIANELLI e OTRANTO, 2012). Considera-se Babesiose causada por *Babesia canis vogeli* e Ehrliquiose causada por *Ehrlichia canis* as doenças de cães mais importantes transmitidas pelo *R. sanguineus* s.l. (DANTAS-TORRES, GIANELLI e OTRANTO, 2012).

Carrapatos do gênero *Amblyomma*, apresentam grande importância para a saúde pública por existirem muitos relatos de parasitismo de humanos (SERRA-FREIRE, 2010). Desta forma, desempenham importante papel como vetores de agentes patogênicos. No homem, infestações causadas por carrapatos podem levar à ocorrência de um quadro de dermatite pruriginosa que provém de reações alérgicas provocadas por substâncias presentes na saliva do ixodídeo e liberadas no local da picada, além da possibilidade de transmissão de doenças infecciosas (LABRUNA e PEREIRA, 2001; LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES et al., 2008; DANTAS-TORRES 2010) apresentando portanto, importância não só para a Medicina Veterinária, mas também para a Medicina Humana.

*A. cajennense* (s.l.) atualmente no Brasil é representado por apenas duas espécies: *A. cajennense* (s.s.) e *A. sculptum* (Martins et al, 2016). Maior destaque tem sido dado ao *Amblyomma sculptum*, espécie considerada como principal vetor de microrganismos do grupo da Febre Maculosa no Brasil (FIGUEIREDO et al., 1999; GUEDES et al., 2005; ONOFRIO et al., 2006; TOLEDO et al., 2008; MARTINS et al., 2016). *A. sculptum* é encontrado no Cerrado, Pantanal e em áreas degradadas da Mata Atlântica nos estados da Região Sudeste e Centro Oeste, Bahia, Paraná e Santa Catarina. Este carrapato apresenta baixa especificidade por hospedeiros parasitando equídeos, bovinos, caprinos, suínos, aves silvestres, cães, gatos, capivaras e o homem (FIGUEIREDO et al., 1999; GUEDES et al., 2005; ONOFRIO et al., 2006; TOLEDO et al., 2008).

O carrapato *A. sculptum* é o principal vetor de *R. rickettsii* no Brasil (LEMOS et al., 1997), onde cavalos e capivaras estão entre os principais hospedeiros primários para todos os estágios parasitários do carrapato (VIEIRA et al., 2004; GUEDES et al., 2005). Este é o principal carrapato que parasita humanos na região Central e Sul do Brasil (LABRUNA et al., 2001). Em condições naturais, *A. sculptum* produz uma geração por ano na região Sudeste do Brasil (LABRUNA et al., 2002). O estágio de larva predomina de abril a julho, ninfas de julho a outubro e adultos de outubro a março (LABRUNA et al., 2002).

Outro carrapato que apresenta importância no Brasil é o *Amblyomma ovale*. O estágio adulto deste carrapato se alimenta preferencialmente de carnívoros em todo Neotrópico (LABRUNA et al., 2005a), sendo o cão doméstico o hospedeiro mais frequentemente relatado (LABRUNA et al., 2005b; MARTINS, MOURA E LABRUNA, 2011). Ao contrário do estágio adulto, larvas e ninfas parasitam pequenos roedores e marsupiais (GUGLIELMONE et al., 2003; MARTINS, MOURA E LABRUNA, 2011) e algumas espécies de aves (OGRZEWALSKA, 2009; MARTINS, MOURA E LABRUNA, 2011). Além de parasitar animais, os carrapatos *A. ovale* adultos parasitam humanos, com vários relatos na América do Sul (GUGLIELMONE et al., 2006; LABRUNA et al., 2005b).

*Amblyomma ovale* também tem sido associado a transmissão de microrganismos do grupo da Febre Maculosa já tendo sido isolado *R. belli* deste carrapato no Sudeste do Brasil (PACHECO et al., 2008). Esta espécie de rickettsia, embora tenha patogenicidade desconhecida para os seres humanos, tem sido encontrada em várias espécies de carrapatos no Brasil (PACHECO et al., 2009). Além desta, *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica já foi identificada em *A. ovale* adulto (SABATINI et al., 2010). *A. ovale* também tem sido associado a transmissão de *Hepatozoon canis* em áreas rurais no Brasil (FORLANO et al., 2005). Além destes, *Amblyomma aureolatum* é também um importante vetor de *Rickettsia rickettsii* no Brasil (PINTER e LABRUNA, 2006).

### **3.2. Rickettsia spp.**

Rickettsias são bactérias que pertencem ao Filo das Proteobactérias, classe Alphaproteobactérias, Ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae e gênero *Rickettsia* (GARRITY et al., 2004). Este gênero é dividido em dois grupos: O grupo do Tifo e o grupo da Febre Maculosa, o qual compreende diversas Rickettsias tais como *R. rickettsii*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, dentre outras associadas ao carrapato. *R. belli*,

apesar de pertencer a mesma família, não faz parte de nenhum dos dois grupos (LABRUNA, 2009).

### 3.2.1. *Rickettsias* do Grupo da Febre Maculosa

A Febre Maculosa é uma zoonose emergente causada por espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa (FMB) (DIAS e MARTINS, 1939). *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria gram negativa pertencente ao gênero *Rickettsia* (GURGEL et al., 2009) é o principal agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) (DIAS e MARTINS, 1939), considerada a mais patogênica dentre as rickettsias, causando elevada mortalidade nos Estados Unidos (PAROLA, PADDOCK, RAOULT, 2005) e no Brasil, com a maioria dos casos registrados na Região Sudeste (Brasil, Ministério da Saúde).

Considerada a infecção mais comum transmitida ao homem por carrapatos (BRITO et al., 2006), tem no Brasil *Amblyomma sculptum* (reportado anteriormente como *A. cajennense*) e *Amblyomma aureolatum* como as espécies de carrapatos mais incriminadas em sua transmissão (LABRUNA, 2006; BRITO et al., 2006; PINTER et al., 2008), visto que esta espécie de carrapato parasita com frequência o homem. Apesar disto, há identificação de *R. rickettsii* em *Rhipicephalus sanguineus* no estado do Rio de Janeiro, em Minas Gerais, São Paulo e Ceará indicando risco potencial de transmissão deste agente para o homem através desta espécie de carrapato no território brasileiro (CUNHA et al., 2009; MORAES-FILHO et al., 2009; PACHECO et al., 2011, SILVA et al, 2017). Apesar deste risco, esta última espécie de carrapato não tem predileção por parasitar o homem. Neste caso o parasitismo é acidental, ou ocorre em locais com infestação, na ausência do cão, seu hospedeiro preferencial. Os carrapatos neste caso além de funcionarem como vetores biológicos funcionam também como reservatórios transmitindo o agente causal desta doença a sua progênie de forma vertical (transovariana) (BRITO et al., 2006) e transestadial (PIRANDA et al., 2011).

O carrapato *Amblyomma sculptum* infectado, quando previamente alimentado transmite o agente etiológico por meio de sua picada quando permanece aderido ao hospedeiro por um período 10 minutos (SARAIVA et al., 2014).

Quando expostos a carrapatos infectados, cães são potencial fonte para infecção humana pelo fato de carregarem carrapatos infectados para áreas não endêmicas e para perto de pessoas (GREENE e BREITSCHWERDT, 2006). Em áreas rurais perto de florestas remanescentes, *A. aureolatum* adultos parasitam principalmente cães, fazendo com que estes desempenhem importante papel em carrear estes carrapatos adultos de dentro da floresta para

o convívio com o homem, aumentando o risco de proprietários de cães adquirirem a doença em áreas onde *A. aureolatum* é o principal vetor (PINTER et al., 2008).

Pinter et al. (2008) observaram em áreas rurais que a infecção de cães com *Rickettsia* aumenta com a idade, já que cães jovens (menores de 6 meses) não são fisicamente capazes de se deslocarem por longas distâncias no interior de florestas, sendo assim menos expostos aos vetores.

Capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*) e cavalos apresentam importante papel na cadeia epidemiológica da doença por serem os principais reservatórios de carrapatos que participam da transmissão da doença (LABRUNA et al., 2002). Capivaras são considerados hospedeiros amplificadores para *R. rickettsii* por serem capazes de gerarem novas linhagens de carrapatos infectados em áreas endêmicas (SOARES et al., 2012).

Vários estudos sugerem desde a década de 30 que capivaras, gambas e coelhos silvestres participam da amplificação de *R. rickettsia* no Brasil (LABRUNA, 2006). Animais amplificadores exercem importante papel na manutenção da bactéria na natureza já que apresentam bacteremia por dias ou semanas, possibilitando que novos carrapatos se infectem. Alguns animais, tais como cães, cavalos e capivaras, exercem o papel de hospedeiros sentinelas para a FMB e outras riquetsioses. Assim, a sorologia nesses animais é considerada um meio diagnóstico eficiente, frequentemente, utilizado para determinar o risco de exposição de seres humanos a *Rickettsia* spp., além de prever alterações na incidência de infecções em pessoas (RAOULT e PAROLA, 2007).

Baseado em inquéritos sorológicos para *R. rickettsii* em sentinelas, pode-se determinar novas áreas para FMB (PADDOCK et al., 2002), além de serem instrumentos valiosos para a vigilância da doença. Apesar dos equinos apresentarem importância na epidemiologia da doença como sentinelas, estes, em condições naturais não são importantes como hospedeiros amplificadores para *R. rickettsii* pois equinos infectados não transmitem a bactéria para os carrapatos *A. sculptum*, apesar de desenvolverem boa resposta humoral (UENO et al., 2016).

Além de sentinelas, os cães são considerados hospedeiros amplificadores de carrapatos aumentando o número de vetores infectados no ambiente (RAOULT e PAROLA, 2007), o mesmo se aplica aos cavalos (PINTER et al., 2008). A sorologia em animais sentinelas é mais preconizada que o uso da PCR já que a detecção da bactéria no sangue é difícil. Isto se deve ao fato da bactéria se multiplicar dentro de células endoteliais e um baixo número destas células é encontrado livre na circulação em casos de doença branda (GEORGE et al., 1993).

No Brasil, casos humanos confirmados da doença tem sido relatados em Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul

(LABRUNA, 2006). Em estudo realizado no norte do estado do Espírito Santo observou-se positividade sorológica em humanos, cães e equinos para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*, tendo sido observada positividade para 6 espécies (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* e *R. felis*), sugerindo que o Norte do Estado do Espírito Santo pode ser considerado endêmico para a Febre Maculosa (SPOLIDORIO et al., 2010). Neste mesmo estudo observou-se soropositividade de 7,6% dos cães testados.

Assim como o homem, cães são susceptíveis a *R. rickettsii*, levando a quadros febris agudos inespecíficos além de trombocitopenia e anemia. Tal fato reforça ainda mais a importância da inclusão desta doença nos diagnósticos diferenciais de clínicos veterinários, visto que vários relatos indicam a ocorrência de febre maculosa em cães e em seus proprietários. Desta forma, o diagnóstico em cães pode ser útil para a prevenção da ocorrência ou de casos letais em humanos (PIRANDA et al., 2008; LABRUNA et al., 2009). A doença clínica em cães foi descrita no país, a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009), pelo fato de possuir sinais clínicos muito parecidos com outras doenças transmitidas por carrapatos, muitas vezes a FMB é confundida pelos clínicos com a Ehrliquiose Monocítica Canina que é a doença transmitida pelo carrapato mais comumente diagnosticada em cães no Brasil.

De acordo com Del Fiol et al. (2010), as taxas de mortalidade de humanos no Brasil são cerca de 10 vezes maiores que nos EUA devido ao atraso no diagnóstico e no estabelecimento de uma terapia apropriada, além do fato da não comercialização de doxiciclina injetável em nosso país nesta época. A partir do ano de 2014 a doxiciclina injetável vem sendo comercializada em nosso país, tendendo a diminuição dos óbitos. Além disto, deve-se ressaltar a importância da consideração desta hipótese diagnóstica principalmente entre os meses de junho e outubro, devido a maior proliferação do carrapato *A. sculptum* nesta época.

Outras espécies de *Rickettsias* do grupo da febre maculosa são identificadas em carrapatos como *R. parkeri*, *R. amblyommattis* e *R. rhipicephali*. Existe relato de *R. parkeri* causando doença leve em um humano nos EUA desde o ano de 2004 (PADDOCK et al., 2004). No Brasil não haviam relatos de doença causada por estas espécies de *Rickettsia* em humanos até o ano de 2010, quando a mesma foi relatada, apesar de já terem sido detectadas em carrapatos anteriormente (SILVEIRA et al., 2007; Spolidorio et al., 2010 a). No Brasil, *R. parkeri* tem sido identificada em carrapatos *A. triste* (SILVEIRA et al., 2007). Clinicamente, *R. parkeri* pode causar em humanos linfadenopatia e lesão papular no local onde o carrapato se fixou pela primeira vez (PADDOCK et al., 2004). Pesquisas desenvolvidas com a bactéria

*R. amblyommatis* apresentam resultados discrepantes no que diz respeito a sua patogenicidade em humanos. Existem relatos de pacientes que desenvolveram sintomatologia típica de febre maculosa, porém de uma forma mais branda (PADDOCK et al., 2004) e outro estudo demonstrou que pessoas infectadas apresentaram elevados títulos de anticorpos contra a bactéria, sem qualquer sintomatologia da doença (STOMDAHL et al., 2008). Outra rickettsia, a *R. belli*, tem sido relatada em 11 diferentes espécies de carrapatos no Brasil sendo contudo, considerada não patogênica (LABRUNA et al., 2011). *R. belli*, *R. rhipicephali* e *R. amblyommatis* são descritos no Brasil, mas não são associados a doença em humanos. Diferente do Brasil, nos Estados Unidos, *R. amblyommatis* já foi apontada como agente causal de doença febril (APPERSON et al., 2008).

De acordo com Labruna et al. (2007), *R. belli* é a espécie de Rickettsia mais comumente observada infectando carrapatos no Brasil, contudo tanto seu papel como o de *R. rhipicephali* como patógenos humanos é desconhecido. A patogenicidade de *R. belli* para cães é ainda desconhecida. Os únicos agentes considerados causadores de doença em seres humanos no Brasil, transmitidas por carrapatos, são *R. rickettsii* (ANGERAMI et al., 2006) e *R. parkeri* (Spolidorio et al., 2010a).

O diagnóstico desta doença pode ser obtido através de sorologia, sendo a reação de imunofluorescência indireta o método mais utilizado; pesquisa direta através de imunohistoquímica de tecidos e reação em cadeia da polimerase (PCR) do sangue total (DEL FIOLE et al., 2010).

### 3.3. Ehrliquiose e Anaplasmosose

A Ehrliquiose e a Anaplasmosose são doenças causadas por bactérias gram negativas intracelulares obrigatórias pertencentes a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero Ehrlichia, Anaplasma e Neorickettsia que acometem tanto o homem quanto os animais (DAGNONE, MORAIS e VIDOTTO, 2001; DAGNONE et al., 2009). São frequentemente observadas em cães infectando plaquetas e leucócitos formando colônias denominadas mórula. As espécies são classificadas em formas monocíticas (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia risticii*), granulocíticas (*Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia equi*) e trombocíticas (*Anaplasma platys*) (COHN, 2003).

São transmitidas por carrapatos Ixodídeos (CALIC et al., 2004), principalmente por *Rhipicephalus sanguineus s.l.* Onde, observa-se a transmissão transtádial podendo portanto,

transmitir os agentes etiológicos ao cão e ao homem através de larvas, ninfas e pelo carrapato adulto (LEWIS et al., 1977 apud DAGNONE, MORAIS e VIDOTTO, 2001).

Cães são acometidos pela Erliquiose monocítica canina, causada por *Ehrlichia canis* e Erliquiose granulocítica canina causada por *Anaplasma phagocytophila* e por *Ehrlichia ewingii* (NEER e HARRUS, 2006). *Anaplasma platys* parasita plaquetas resultando na doença conhecida como trombocitopenia cíclica canina (TROY et al., 1990). *E. canis* infecta monócitos e tem sido associados a quadros graves, as vezes fatal em cães (NEER e HARRUS, 2006). A co-infecção entre *A. platys* e *E. canis* em cães frequentemente observada (RAMOS et al, 2010; AKTAS et al., 2015).

Em humanos são responsáveis pelo desenvolvimento da Anaplasmosse Granulocítica Humana (HGA) causada por *Anaplasma phagocytophila* e Ehrlichiose Monocítica Humana (HME) causada por *Ehrlichia chaffeensis*. Alguns pesquisadores utilizam o termo erliquiose granulocítica humana para infecções causadas por *Ehrlichia ewingii*, contudo nestes casos o termo Ehrliquiose ewingii humana vem sendo mais utilizado (OLIVEIRA, 2008).

Observa-se que o agente causador da Ehrliquiose Monocítica Humana, *Ehrlichia chaffeensis* pode infectar naturalmente várias espécies animais incluindo o cão e que o agente etiológico da Ehrliquiose Monocítica Canina, a *Ehrlichia canis* pode ser patogênica para humanos (DAGNONE, MORAIS e VIDOTTO, 2001), já tendo sido descrita sua infecção em humanos na Venezuela (PEREZ, RIKIHISA e WEN, 1996; PEREZ et al, 2006). Desta forma, cães podem ser carreadores destes agentes em regiões endêmicas (DINIZ et al., 2007).

No Brasil, o primeiro relato de casos suspeitos de ehrlichiose em humanos ocorreu em 2004 no Estado de Minas Gerais (CALIC et al., 2004). Em 2006 novos casos foram relatados em Minas Gerais em pacientes com quadros febris e histórico de ataque prévio por carrapatos (COSTA et al., 2006). De acordo com Calic et al. (2004), a dificuldade no estabelecimento do diagnóstico das infecções rickettsiais humanas através de métodos microbiológicos, criam uma falsa idéia de que as infecções causadas por *Ehrlichia* são raras e sem importância.

Anaplasmosse é uma doença que acomete animais e humanos (DUMLER et al., 2001), sendo *A. platys* (anteriormente reportada como *Ehrlichia platys*) amplamente distribuída na população canina brasileira (DANTAS – TORRES, 2008). *A. platys* tem sido identificada através de PCR do sangue de cães em várias regiões do Brasil com prevalência variando entre 15,84% e 55% (FERREIRA et al., 2007; DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2009). Alguns relatos de infecção humana por *A. platys* também tem sido publicados (MAGGI et al., 2013; BREITSCHWERDT et al., 2014), incluindo relatos na América do Sul (Venezuela) (ARRAGA-ALVARADO et al., 2014).

No Brasil, *E. canis* foi considerada até pouco tempo a única espécie de Ehrlichia que acometia cães (AGUIAR et al., 2007; AGUIAR, HAGIWARA e LABRUNA, 2008), observando-se elevada incidência em diferentes regiões do Brasil, variando de 38,9% (SANTOS et al., 2009) a 78% dos cães examinados (DINIZ et al., 2007). Contudo, em 2008 *Ehrlichia ewingii* foi identificado pela primeira vez em cães no Brasil no município de Viçosa em Minas Gerais (OLIVEIRA, 2008).

*Ehrlichia canis* é o agente etiológico da doença transmitida por carrapatos mais prevalente em cães no Brasil (DAGNONE et al., 2009; SOUZA et al., 2013). Tal fato se deve a grande distribuição do carrapato vetor na maioria das áreas urbanas no Brasil (AGUIAR, HAGIWARA e LABRUNA, 2008). Embora a doença seja descrita atualmente em todo o país, os dados de prevalência diferem em relação à população, área geográfica, presença do vetor e teste de diagnóstico empregado. A presença de vetores competentes, bem como hospedeiros reservatórios geralmente determinam a ocorrência de ehrlichiose (MORAES-FILHO et al., 2015). Sabe-se que existem diferentes populações de *R. sanguineus* no Brasil o que pode determinar diferenças marcantes na prevalência destas doenças em diferentes regiões no território nacional (MOARES-FILHO et al., 2011), como ocorre no município de Porto Alegre, onde a ocorrência foi nula em pesquisa realizada por Lasta et al. (2013).

No norte do Estado do Espírito Santo, observou-se, através de resultados sorológicos e moleculares, quantidade significativa (41,3%) de cães infectados por *E. canis*, concluindo tratar-se de uma área endêmica para Ehrlichiose Canina (SPOLIDORIO et al., 2010). Neste mesmo estudo, embora não tenha sido detectado DNA ehrliquial nos sangues humanos analisados, pelo menos 2% destes foram reativos para *E. canis*, através da Imunofluorescência (RIFI), podendo representar uma infecção acidental pela *E. canis*.

O diagnóstico desta doença pode ser obtido através de esfregaço sanguíneo, citologia utilizando-se o corante Giemsa, sorologia, cultura de células, imunoaglutinação e PCR (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008c).

Devido ao potencial zoonótico desses agentes infecciosos, sua identificação precisa e caracterização genética em cães é importante, pois permite estimar o risco de transmissão para os seres humanos e identificar a presença de variantes genéticas melhor adaptadas a um hospedeiro específico (SOARES et al., 2017).

### 3.4. Babesiose

A babesiose é uma doença causada por hemoprotozoário do gênero *Babesia*, família Babesiidae, ordem Piroplasmida e Filo Apicomplexa (IRWIN, 2009) e transmitida por carrapatos que infectam eritrócitos levando a lise de hemácias (TABOADA e LOBETTI, 2006). Apresenta distribuição mundial com importância para a saúde pública e para a medicina veterinária. É uma doença comum para a medicina veterinária, mas os casos em humanos são raros. Contudo, observa-se recente aumento de frequência da doença em humanos sendo, portanto considerada emergente (BRITO et al., 2006; JEFFEIES et al., 2007).

Nos EUA e na Europa os casos humanos da doença estão associados respectivamente a *Babesia microti* e a *Babesia divergens* (HOMER et al., 2000). É transmitida por carrapatos ixodídeos, sendo a transmissão para humanos usualmente realizada através das ninfas, podendo também em alguns casos ser adquirido pelas vias transplacentária, durante o parto e através de transfusão sanguínea (LEDER e WELLER, 2009).

No Brasil são escassas as descrições de doença em humanos. O primeiro relato de infecção humana por *Babesia sp.* ocorreu no estado de Pernambuco, diagnosticado através de esfregaço sanguíneo (ALECRIM et al., 1983) não tendo sido portanto, identificada a espécie envolvida.

Cães podem ser acometidos pela *Babesia gibsoni* e pela *Babesia canis* que pode ser dividida em três subespécies: *B. canis canis*, encontrada na Europa e transmitida por *Dermacentor reticulatus*, *B. canis vogeli*, encontrada no Nordeste da África e Norte da América (LEWIS et al., 1996) e em regiões tropicais e subtropicais da maioria dos continentes (TABOADA e LOBETTI, 2006), transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* s.l. e *B. canis Rossi* encontrada no Sul da África e transmitida por *Haemaphysalis leachi* (LEWIS et al., 1996).

No Brasil o primeiro relato de *B. canis vogeli* ocorreu em 2005 através de PCR em cães naturalmente infectados (PASSOS et al., 2005). Este mesmo agente foi observado através de testes sorológicos e moleculares em 33,7% dos cães examinados em estudo realizado no norte do Estado do Espírito Santo, não tendo sido detectado nenhum caso de infecção em humanos (SPOLIDORIO et al., 2010), sendo esta a espécie mais frequentemente observada em cães no Brasil (SOUSA et al., 2013).

Embora casos humanos de babesiose causadas por *B. canis* e *B. bovis* não tenham sido documentados em diversas partes do mundo, considera-se que os animais domésticos

expostos aos carrapatos contaminados possam funcionar como fonte de infecção para humanos (TABOADA e LOBETTI, 2006).

O diagnóstico é feito através da visualização microscópica do agente parasitando eritrócitos em esfregaço de sangue periférico (DANTAS – TORRES e FIGUEREDO, 2006), sorologia, imunofluorescência indireta e PCR (DANTAS – TORRES e FIGUEREDO, 2006; TABOADA e LOBETTI, 2006).

### 3.5. Hepatozoonose

A Hepatozoonose é uma doença descrita em vários países, causada por protozoários do gênero *Hepatozoon* que podem afetar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados por todo o mundo (SMITH, 1996).

A Hepatozoonose canina pode ser causada por duas espécies, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*, sendo no Brasil detectado apenas o *H. canis* em cães domésticos (SPOLIDORIO, 2009; GONÇALVES, 2014) e *H. americanum* em canídeos selvagens (ANDRÉ et al., 2010).

Os animais se infectam através da ingestão dos hospedeiros definitivos contendo oocistos maduros (BANETH et al., 2001). Após a ingestão são liberados esporozoítos que infectam fagócitos mononucleares e células endoteliais de alguns órgãos como pulmão, baço, medula óssea, fígado, músculo e formam cistos contendo macromerontes e micromerontes. Esses micromerontes vão se desenvolver em micromerozoítos que são responsáveis pela infecção dos leucócitos e se desenvolvem em gamontes (LAPPIN, 2015).

No Brasil, a transmissão de *H. canis* para cães de áreas urbanas tem sido associado ao *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (SPOLIDORIO et al., 2009, MIRANDA et al., 2014), enquanto que nas áreas rurais tem sido associado ao *Amblyomma ovale* (FORLANO et al., 2005) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MIRANDA et al., 2011). Em cães a doença pode ocorrer associada a outras doenças imunossupressoras (O'DWYER e MASSARD, 2001), dificultando a identificação dos sinais clínicos.

*Hepatozoon canis* tem sido descrito em cães de várias regiões do Brasil com frequências variando de 0,48% em Recife (RAMOS et al., 2010), 3,63% em Campo Grande, MS (RAMOS et al., 2015) a 75,9% em Uberlândia, MG (MIRANDA et al., 2014), ambos de áreas urbanas. Em estudo realizado no norte do Estado do Espírito Santo, observou-se, através de resultados moleculares, quantidade significativa (58,7%) de cães infectados por

*Hepatozoon*, concluindo tratar-se de uma área endêmica para Hepatozoonose Canina (SPOLIDORIO et al., 2009). A doença é muitas vezes sub-diagnosticada devido ao fato de possuir muitos sinais clínicos semelhantes a outras doenças transmitidas por carrapatos como a Babesiose e a Ehrliquiose (GREENE et al., 2006). Além disto, cães infectados por *H. canis* geralmente aparentam estar saudáveis já que a doença é geralmente inaparente e subclínica, sendo o diagnóstico confirmado ocasionalmente durante exames laboratoriais (PALUDO et al., 2005).

Concomitantemente à hepatozoonose podem ser encontradas outras doenças imunossupressoras, como ehrlichiose e babesiose podendo, portanto serem observados sinais clínicos variados entre os indivíduos portadores (BANETH, 2006; O'DWYER e MASSARD, 2001). Os sinais mais frequentes encontrados em cães são palidez de mucosas, anorexia, emagrecimento e dores musculares (CRAIG, 1998), além de febre, hiperestesia, corrimento oculonasal, meningoencefalomielite e diarreia com sangue, podendo estes sinais serem intermitentes e recorrentes (LAPPIN, 2015).

O diagnóstico de hepatozoonose é baseado nos sinais clínicos, exame parasitológico de sangue (visualização de gamontes parasitando leucócitos), biópsia de músculo (visualização de merogonia), imunohistoquímica, sorologia e PCR (LI et al., 2008).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local de Coleta**

As amostras dos cães deste estudo eram provenientes de cães residentes em seis municípios do Estado do Espírito Santo (Alegre, Colatina, Santa Teresa, Serra, Vila Velha e Vitória), enquanto que as amostras dos equinos foram provenientes apenas dos municípios de Vila Velha (VV) e Vitória. Estes equinos residiam ou transitavam por regiões (bairros) onde foram observados cães com sorologia positiva para alguma das espécies de *Rickettsia* testadas neste estudo (Bairros Soteco – VV, Itapuã – VV, Ulisses Guimarães – VV, Fradinhos – Vitória). Neste estudo, foi realizada a coleta de material biológico (sangue total e soro) de 378 cães (226 fêmeas e 152 machos), de diversas raças e idades variando de 4 meses a 15 anos (média de 4,1 anos); com ectoparasitismo de carrapatos ou histórico de parasitismo recente - até 30 dias. Estes animais foram triados por um período de um ano, durante consulta veterinária de anual de rotina e ou em caso de manifestação de doenças no Hospital Veterinário da Universidade Vila Velha – UVV, Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESC Colatina, Hospital Veterinário da UFES campus Alegre e durante uma campanha de castração da ESFA em Santa Teresa.

Além das amostras de sangue dos cães, foram coletadas amostras de sangue de 10 equinos. Dados referentes aos equinos tais como idade, não foram obtidos. Além disto, no dia da visita a estes animais não foram encontrados carrapatos nos mesmos.

O sangue foi coletado por meio de venopunção da cefálica dos cães e da jugular dos equinos para realização de análises moleculares e sorológicas visando a identificação de agentes bacterianos e protozoários, bem como a presença de anticorpos produzidos contra agentes transmitidos por carrapatos.

### **4.2. Coleta e acondicionamento de espécimes de carrapatos**

Carrapatos em diversos estágios foram coletados com o uso de pinças de ponta fina diretamente da pele de cães infectados através de movimentos de torção sobre o próprio eixo do ectoparasito. Após coleta os espécimes foram preservados em frascos coletores universais de 50 ml contendo 10 ml de álcool absoluto (ou volume suficiente para encobrir totalmente os carrapatos quando necessário).

### **4.3. Identificação morfológica dos carrapatos**

Os carrapatos foram identificados segundo critérios apresentados por Barros – Battesti et al. (2006) e Martins et al. (2016), utilizando-se lupa estereoscópica no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os dados foram arquivados e analisados.

### **4.4. Extração de DNA dos carrapatos para posterior identificação de patógenos**

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi extraído o DNA total dos carrapatos conforme descrito abaixo:

Os carrapatos de cada animal foram separados por espécie para a extração em microtubos de 1,5 ml, conforme previamente descrito por Sangioni et al. (2005), adaptado. O DNA foi extraído em pools de carrapatos da mesma espécie encontrados no mesmo cão. Cada espécime foi triturado com auxílio de agulha estéril, acrescido de 150 µl de solução tampão TE pH 8,0 (10mM TRIS HCl; 1mM EDTA) e 450µl de Isotiocianato de guanidina por 10 minutos, seguido de homogeneização e adição de 100µl de Clorofórmio. Após centrifugação (12.000 g por 5 minutos), foram recuperados aproximadamente 300µl do sobrenadante e transferidos para um novo microtubo de 1,5 ml estéril, sendo acrescidos 600µl de Isopropanol e armazenado em freezer (-20°C) por no mínimo 2 horas. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 g à 4°C por 15 minutos) e o sobrenadante descartado, o sedimento foi ressuspensão em 800µl de Etanol 70% e novamente centrifugado (12.000 g à 4°C por 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento exposto à temperatura ambiente por uma hora e em seguida acrescido 60µl de TE e aquecido em termobloco (56°C por 5 minutos). Essa solução final (DNA diluído em TE) foi armazenada em freezer (-20°C) até sua utilização na PCR. Utilizou-se controle negativo para cada 10 amostras extraídas.

### **4.5. Extração de DNA de amostras de sangue de cães infestados por carrapatos**

Foram coletados sangue dos cães infectados por carrapatos mediante assinatura pelo proprietário de cada animal de termo de consentimento através de punção da veia cefálica, para realização de análises moleculares visando a identificação de agentes bacterianos e protozoários transmitidos por este ectoparasito. O sangue coletado foi acondicionado em tubos de ensaio estéreis contendo anticoagulante EDTA e congelados a - 20°C até a extração

do DNA (SPOLIDORIO et al., 2010). Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi extraído o DNA total do sangue através do kit comercial da Qiagen (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram eluídas em 100 µl de tampão TE. Foi utilizado um controle negativo (água destilada livre de DNA) para cada 20 amostras extraídas simultaneamente.

#### 4.6. Reação em Cadeia da polimerase (PCR)

##### 4.6.1. *Babesia* spp.

Para detecção do gênero *Babesia*, foi realizado PCR com os *primers* BAB-143-167 senso e BAB-694-667 anti-senso, correspondentes a regiões conservadas do gene 18S rRNA de *Babesia* spp., que amplificaram um fragmento de aproximadamente 551-pb, assim como previamente estabelecido por Spolidorio et al. (2009) (Tabela 1). Utilizou-se como controle positivo (DNA de cão infectado com *B. canis*) e controle negativo (água livre de DNA) em cada reação.

Realizou-se a PCR em solução total de 50 µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), e 0,2 mM de cada *primer*. Os ciclos da primeira PCR, realizada com os primeiros pares de *primers*, consistiram em uma desnaturação inicial por 3 minutos à 95°C, e 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C, e 30 segundos a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C. Na segunda PCR a desnaturação inicial utilizada foi de 5 minutos à 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à 58°C, e 30 segundos à 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final à 72°C.

##### 4.6.2. Anaplasmataceae

Para detecção de organismos da família Anaplasmataceae, foi utilizado PCR com os *primers* GE2 senso e HE3 anti-senso para amplificar um fragmento de 360-pb do gene 16S RNA ribossomal (rRNA) gene de Anaplasmataceae (Tabela 1). Realizou-se as PCR num total de 50 µl contendo uma solução Tampão de 1X PCR desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 1 U Platinum TaqDNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 0,2 mM de cada *primer*. Os ciclos de PCR consistiam de uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, e 40 ciclos repetitivos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 62°C, e 30 seg a 72°C, seguido por uma

extensão final de 7 minutos a 72°C. Como controle positivo utilizou-se o DNA do sangue de um cão infectado com *Ehrlichia canis* e o controle negativo consistiu de água e mix sem adição de DNA.

#### 4.6.3 *Hepatozoon* spp.

Para pesquisa de *Hepatozoon* spp. foi utilizado PCR (HEP2) com os *primers* HEP-144-169 senso e HEP-743-718 anti-senso, que amplificaram um fragmento de cerca de 574-pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. (Tabela 1). Todas as reações de PCR foram realizadas em solução total de 50 µl contendo 1X PCR Buffer desprovido de Mg, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen, Calsbad, CA) e 0,2 mM de cada *primer*. Os ciclos de temperaturas da PCR (HEP2) utilizou-se uma desnaturação inicial por 5 minutos de extensão final à 95°C e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C, seguidos por 7 minutos de extensão final a 72°C.

#### 4.6.4 *Rickettsia* spp.

Para pesquisa de *Rickettsias* nos carrapatos, cada amostra de DNA foi submetida à PCR utilizando-se oligonucleotídeos de alta sensibilidade (“*primers*”) denominados CS-78 senso (“*Forward*”) e CS-323 anti-senso (“*reverse*”), que amplificam um fragmento de 401 pares de base (pb) do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004). As amostras positivas na primeira reação foram submetidas a uma nova reação com um par de *primers* (*Rr190.70p* senso e *Rr190.602n* anti-senso) que amplificam um fragmento de 530-pb do gene da proteína externa de membrana 190-kDa (*OmpA*), restrito as *Rickettsias* do grupo da Febre Maculosa (REGNERY et al., 1991) (Tabela 1). Para cada reação foram utilizados controles negativos (água de miliq livre de DNA) e positivos (*Rickettsia* sp. cepa NOD).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200µl adicionando 2,5µl de DNA extraído acrescido de 22,5 de Mix (12,6µl de água de miliqui; 4µl de Buffer [200mM Tris pH 8.4, 500 mM Kcl, Invitrogen®]; 2,5µl de dNTP [Invitrogen®]; 1,25µl de cada *primer*; 0,75µl de Cloreto de Magnésio [50 mM, Invitrogen®]; e 0,15µl de Taq polimerase [Invitrogen®]), para um volume total de 25µl de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®), para o gene *gltA* serão

conforme segue: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 40 segundos à 72°C, e 7 minutos à 72°C; Para o gene *OmpA* serão seguidos: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 45 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C.

**Tabela 1.** Lista de todos os *primers* utilizados na elaboração do projeto

Gene Alvo e primers	Especificidade de da PCR	Sequência dos primers (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Referência
<i>6S rRNA</i>	Anaplasmataceae	F- GTTAGTGGCAGACGGGTGAGT R- ATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	360-bp	Breitschwer, E.B.; Hegarty, B.C.; Hancoc, S.I., 1998
<i>8S rRNA</i>	<i>Babesia</i> spp.	F- CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA R- GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG	551-bp	Almeida, A.P., 2011
<i>8S rRNA</i>	<i>Hepatozoon</i> spp.	F- GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC R- ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG	574-bp	Almeida, A.P., 2011
<i>sb</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	F- TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGA AACA R- GCTGCTCAACCAAGAAATGTATCCCC TA Probe- AGCTAGTGCTGCTGGGCAACTTTGA GTGAA	378-bp	Doyle, C.K., 2005
<i>gltA</i>	Gênero <i>Rickettsia</i>	F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT R- GCTTCCTTAAAAATCAATAAATCAGGAT	401-pb	Labruna, M.B. et al, 2004
<i>OmpA</i>	Grupo da Febre Maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532-pb	Regnery, R.L.; Spruil, C.L.; Plikaytis, B.D., 1991.

#### 4.7. Leitura e análise dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR, 10µl de DNA de cada amostra amplificado acrescido de 3 µl de corante (Gel Loading Buffer – Invitrogen®), foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M

ácido bórico; 12,49 mM EDTA) à 110v/50mA. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µl/ml – Invitrogen®) e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphalmager®). As amostras que revelaram bandas na altura do controle positivo foram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada.

#### 4.8. PCR em tempo real para *Ehrlichia canis*

Os materiais obtidos da extração (sangue canino) foram testados para presença de DNA específico de *Ehrlichia canis* através de um protocolo de PCR em tempo real utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Dsb-321 (5'- TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA-3'), Dsb-671 (5'- GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA-3'), e a sonda TaqMan (5'- AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3'), 5' FAM/BHQ - 1 3', específica para a espécie *E. canis*, conforme previamente padronizado (DOYLE et al., 2005). A reação foi realizada em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por minuto, conforme descrito por Doyle et al. (2005). A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas em um sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems – Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA).

#### 4.9. Sequenciamento

As amostras de sangue canino positivas nas PCRs convencionais para Anaplasmatacea, *Babesia* sp. e *Hepatozoon* sp. foram sequenciadas no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia (IB) da USP. A purificação do produto amplificado foi realizada com uma combinação de duas enzimas: Shrim Alkaline Phosphatase (SAP), que degrada nucleotídeos não incorporados e a Exonuclease I (EXO), que degrada primers residuais e demais produtos de fita simples indesejáveis. Para isso, foram misturados 8 µl de produto da PCR em 5 µl de EXO/SAP e incubou-se em termociclador por 1h a 37°C e depois por 15 minutos a 80°C. Foram acrescidos 5 µM de primers internos (Tg18s58F e Tg18s348R) a esse produto. As amostras foram levadas ao IB para a reação de sequenciamento utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (cod. 4337456) e sequenciadas utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystem, CA, USA).

#### 4.10. Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Rickettsia* spp.

Amostras de sangue foram transportados a temperatura ambiente para o laboratório onde foram centrifugados (1500g, 10 minutos), e os soros alíquotados em microtubos etiquetados e armazenadas a -20°C até serem testadas pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando antígenos brutos provenientes de cinco espécies de *Rickettsia* do Brasil: *R. bellii* estirpe Mogi, *R. amblyommii* estirpe Ac37, *R. rhipicephali* estirpe HJ5, *R. rickettsii* cepa Taiacu e *R. parkeri* cepa At24. Cada *Rickettsia* foi cultivada em células Vero e colhida quando quase 100% das células estavam infectadas. As células infectadas foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos e os pellet lavados em 0,1 M de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4), novamente centrifugado, e resuspensas em PBS contendo 1% de soro fetal bovino e azida sódica a 0,1%. Dez microlitros de células infectadas com rickettsias foram utilizados para cada poço de 12 slides antígeno. As lâminas com os antígenos foram secas ao ar e, em seguida, fixadas em acetom por 10 minutos. As lâminas foram mantidas a -80°C até ser utilizado. Soros caninos foram diluídos em incrementos duplos com PBS a partir de diluição 1:64. Dez microlitros das diluições foram adicionados a cada uma das lâminas com antígeno. As lâminas foram incubadas a 37 ° C por 30 minutos em uma caixa com umidade. As lâminas foram lavadas uma vez e depois lavadas duas vezes durante 10 minutos em PBS. A lâminas foram incubadas com imunoglobulina G de coelho anti-cão (IgG; Sigma diagnostics, St. Louis, MO), marcadas com fluoresceína isothiocianato e lavadas como descrito acima. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada. As lâminas foram lidas com um microscópio ultravioleta (Olympus BX60, Japão) com 400 X de ampliação. Para cada amostra, o título final (end-point) para reagir com cada um dos cinco antígenos de *Rickettsia* foi determinado. Todas as reações foram realizadas com o mesmo lote de reagentes, incluindo o anticorpo secundário, que sempre utilizado na diluição de 1:600. As lâminas foram lidas por duas pessoas. Soros reativos foram testados em duas ou três repetições antes de determinar a título de ponto final (end-point) (LABRUNA et al., 2007). Em cada lâmina, um soro anteriormente demonstrado ser não reativo (controle negativo) e um soro reativo conhecido (controle positivo) foram testados na diluição de 1:64, ambos de estudos de Szabó et al. (2013).

As amostras de soro equino foram testadas pela imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando antígenos brutos derivados de 5 *Rickettsia* spp. isolados do Brasil (estirpe de *R. rickettsii* Taiacu, estirpe At24 de *R. parkeri*, estirpe Ac37 de *R. amblyommatis*, estirpe de *R. Rhipicephali* HJ5 e estirpe de *R. bellii* Mogi), como descrito anteriormente (Labruna et al.,

2007). Resumidamente, os soros foram diluídos em incrementos de duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), a partir da diluição de 1:64. As lâminas foram incubadas com IgG anti-cão de coelho marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, St Louis, MO, EUA), que tinha sido previamente titulada para a melhor diluição de trabalho (1:1000). Para cada amostra, o título de IgG do ponto final reagindo com cada um dos cinco *Rickettsia* spp. os antígenos foram determinados. Em cada slide, um soro demonstrado anteriormente como não-reativo (controle negativo) e um soro reativo conhecido (controle positivo, título inverso do ponto final de 1024), ambos dos estudos de Moraes-Filho et al. (2009a), foram testados na diluição 1:64.

#### **4.11. Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis***

Amostras individuais de soro foram testadas usando como antígeno, células DH82 infectadas com *Ehrlichia canis*, produzida com uma cepa brasileira (cepa São Paulo) isoladas de um cão naturalmente infectado (AGUIAR et al., 2008), preparados em uma cultura celular como descrito anteriormente (AGUIAR, 2007). Utilizou-se fluoresceína conjugada com anti-IgG de cão (Sigma) previamente titulada anterior à diluição (1:600). O soro foi considerado como contendo anticorpos reativos a *Ehrlichia canis* se mostrado uma reação na diluição de 1:80 (Krawczak et al., 2012). Soluções de bloqueio (albumina sérica bovina [BSA] 1% em PBS para soros de cães) foram utilizados para diminuir o background. Em cada lâmina, um soro anteriormente demonstrado ser não reativo (controle negativo) e um conhecido como reativo (controle positivo, título final de 1280) foram testados na diluição de 1:80. Estas amostras de soro controle foram derivadas do estudo de Aguiar et al. (2007).

## **5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

A coleta dos materiais biológicos dos animais foi previamente aprovada pelo comitê de ética animal da Universidade Vila Velha (numero 215/2012). As amostras foram colhidas mediante assinatura de termo de consentimento pelo proprietário de cada animal.

## **6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As análises tiveram com base a produção inicial de estatísticas descritivas para os dados coletados, seguidas da realização de testes estatísticos t de significância, ao nível de 5%, teste do qui-quadrado com correção de Yates, também ao nível de 5%, e da produção de intervalos de confiança (IC), ao nível de 95% (Pagano e Grauvreau, 2006). Utilizou-se o R Software.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Identificação dos Carrapatos

Dos 378 cães examinados, 157 (41,53%; IC 36,54% - 46,52%) apresentavam carrapatos no momento da consulta os quais foram coletados, fixados em álcool absoluto e identificados como *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) (Figura 1) em 154 animais (98,1%), *Amblyomma ovale* (Figura 2), em um animal (0,63%) proveniente da zona rural do município de Santa Teresa e *Amblyomma sculptum* (Figura 3), em dois animais (1,27%) provenientes do município de Colatina, residentes em área próxima a um fragmento de mata (Figura 2). Esta última espécie, até pouco tempo era classificada como *Amblyomma cajennense* nesta região de estudo (Martins et al. 2016). Um total de 941 carrapatos foram coletados, sendo 938 *R. sanguineus* (352 adultos fêmeas, 437 adultos machos, 147 ninfas, 5 larvas). O cão mais infestado apresentava 36 carrapatos no momento da coleta.

**Figura 1.** Imagem do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l, vista dorsal. 5,6x, SZX7 Stereo Microscopes – Olympus



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 2.** Imagem do carrapato *Amblyomma ovale*, vista dorsal. 5,6 x, SZX7 Stereo Microscopes – Olympus



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 3.** Imagem do carrapato *Amblyomma sculptum*, vista dorsal. 5,6 x, SZX7 Stereo Microscopes – Olympus



Fonte: Arquivo pessoal

## 7.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Todos os animais examinados (378) tiveram sangue total coletados para a realização da PCR Real Time para *E. canis* e PCR convencional para: *Babesia* spp., PCR para *Hepatozoon* spp., Anaplasmataceae. Destes, 34 animais (8,99%; IC 6,09% - 11,89%; p-valor<0,001) foram positivos para Anaplasmataceae, 28 animais (7,4%; IC 4,75% - 10,06%; p-valor<0,001) foram positivos para *E. canis* pelo PCR real time, cinco animais (1,32%; IC 0,17% - 2,48%; p=0,025) positivos para *Babesia* sp. e 39 animais (10,31%; IC 7,23% - 13,40%; p<0,001) positivos para *Hepatozoon* sp. Observou-se co-infecção com dois ou três agentes em 22 animais (5,82%; IC 3,45% - 8,19%; p-valor<0,001). Co-infecção por *Hepatozoon canis*, *E. canis* e *A. platys* foi observada em três animais, *Hepatozoon canis* e *A. platys* em três animais, *Hepatozoon canis* e *E. canis* em dois animais, *E. canis* e *A. platys* em 11 animais e *E. canis* e *Babesia canis vogeli* em um animal. A associação entre as diferentes infecções investigadas foi estatisticamente significativa apenas para *E. canis* e Anaplasmataceae (p-valor<0,001).

Os resultados de cada reação de PCR empregados encontram-se detalhados a seguir, separados por município.

### 7.2.1. Municípios da Grande Vitória

Dos 378 animais deste estudo, 231 eram provenientes de municípios da Grande Vitória (Vila Velha, Vitória e Serra) e atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Vila Velha, sendo, 143 fêmeas e 87 machos com média de idade de 4,1 anos. Dos 231 cães, 117 (50,6%) apresentavam carrapatos no momento da consulta todos identificados como *R.*

*sanguineus* s.l. (100% deles). Destes animais a PCR foi positiva em 4 (1,73%) para *Babesia* sp., 11 (4,76%) para *Hepatozoon* sp e 17 animais (7,36%) para Anaplasmataceae. Na PCR em tempo real 10 animais (4,32%) foram positivos para *E. canis*.

#### 7.2.2. Colatina

Do total de animais arrolados 47 eram provenientes de Colatina e foram atendidos no Hospital Veterinário da UNESC sendo 28 fêmeas e 19 machos com média de idade de 4,1 anos. Dos 47 animais, 26 (55,3%) apresentavam carrapatos no momento da consulta, que foram identificados como *R. sanguineus* em 24 animais (92,3%) e *A. cajenense* em dois animais (7,7%). Destes animais, a PCR foi positiva em 8 (17,02%) para *Hepatozoon* sp. e em 3 (6,38%) para Anaplasmataceae. Outros 3 (6,38%) animais foram positivos para *E. canis* no PCR em tempo real.

#### 7.2.3. Santa Teresa

Em Santa Teresa (sede e áreas rurais do município), foram arrolados 31 animais por ocasião da campanha de castração promovida pela Prefeitura e Faculdade de Medicina Veterinária da ESFA. Dos 31 cães, 29 eram fêmeas e 9 eram machos com média de idade de 2,6 anos. Deste total, apenas um (3,2%) apresentava carrapato no momento da consulta sendo o mesmo identificado como *A. ovale*, o primeiro desta espécie identificado nesta região do Estado (ACOSTA et al., 2016). A baixa incidência de carrapatos nestes cães se deve sobretudo ao pré-requisito exigido pelos organizadores da campanha de castração (banho prévio e uso de ectoparasiticida). Destes animais, um (3,23%) foi positivo para *E. canis* no PCR Real Time e 3 animais (9,68%) foram positivos para *Hepatozoon* sp. no PCR.

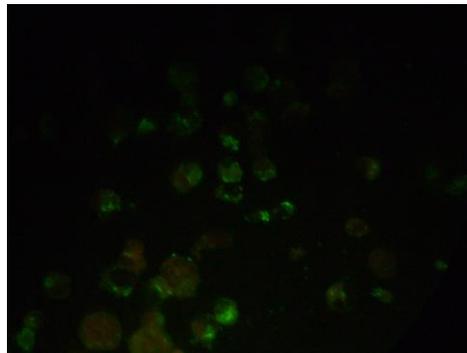
#### 7.2.4. Alegre

O município de Alegre contribuiu com 69 animais que foram triados no Hospital Veterinário da UFES: 32 fêmeas e 37 machos com média de idade de 4,8 anos. Destes, 13 animais (18,84%) apresentavam carrapato no momento da consulta, sendo 100% identificados como *R. sanguineus* s.l. Na PCR 1 cão (1,45%) foi positivo para *Babesia* sp. 17 (24,64%) para *Hepatozoon* sp. 14 cães (20,29%) para Anaplasmataceae e 14 cães (20,29%) para *E. canis* na PCR em tempo real (Tabela 2).

### 7.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

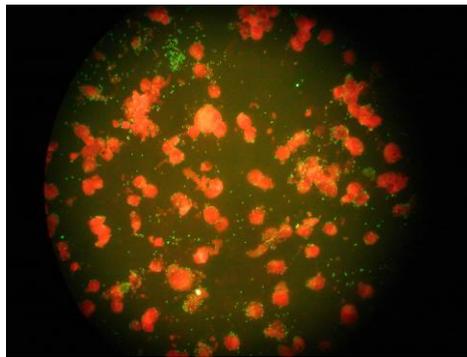
Dos 378 cães do estudo, 312 tiveram amostras de soro sanguíneo coletados para a realização de exames sorológicos: reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *E. canis* (Figura 4) e para cinco espécies de *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*) (Figura 5). Os resultados da soroprevalência por município estão listados na Tabela 2.

**Figura 4.** Imunofluorescência indireta (RIFI) de *Ehrlichia canis* no soro de um cão infectado (400 X).



Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 5.** Imunofluorescência indireta (RIFI) de *Rickettsia* sp. no soro de um cão infectado (400 X).



Fonte: Arquivo Pessoal

**Tabela 2.** Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de sangue de cães de 6 municípios do Estado do ES, Brasil

Nº de cães positivos (%)				
Agentes investigados	Grande Vitória*	Colatina	Alegre	Santa Teresa
Sorologia	(N = 203)	(N = 49)	(N = 25)	(N = 35)
<i>Rickettsia rickettsii</i>	4 (1,97)	0 (0)	0 (0)	1 (0,49)
<i>R. parkeri</i>	4 (1,97)	0 (0)	0 (0)	2 (0,98)
<i>R. amblyommii</i>	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>R. rhipcephali</i>	2 (0,98)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>R. bellii</i>	3 (1,47)	0 (0)	0 (0)	0 (0,0)
<i>Ehrlichia canis</i>	47 (23,15)	14 (28,57)	8 (32,00)	2(5,71)
PCR	(N = 231)	(N = 47)	(N = 69)	(N = 31)
<i>Anaplasmataceae</i>	17 (7,36)	3 (6,38)	14 (20,29)	0 (0)
<i>Babesia</i>	4 (1,73)	0 (0)	1 (1,45)	0 (0)
<i>Hepatozoon</i>	11 (4,76)	8 (17,02)	17 (24,64)	3 (9,68)
PCR real time	(N = 231)	(N = 47)	(N = 69)	(N = 31)
<i>Ehrlichia canis</i>	10 (4,32)	3 (6,38)	14 (20,29)	1 (3,23)

\* Municípios de Vila Velha, Vitória e Serra

### 7.3.1. RIFI para *Rickettsia* spp.

Dos 312 cães, 16 (5,13%) analisadas por RIFI apresentaram títulos  $\geq 64$  para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* das cinco testadas (Tabela 2). Destes, 5 (1,6%) apresentaram títulos  $\geq 64$  para *R. rickettsii*, sendo três de Vila Velha, um de Vitória e um de Santa Teresa.

Não houve amostras positivas para nenhuma espécie de *Rickettsia* testada dentre as amostras coletadas de cães oriundos dos municípios de Alegre e de Colatina.

Os exames sorológicos dos mostram dois equinos com sorologia positiva para *R. bellii* com titulação de 1:64 e 1:128 residentes respectivamente nos bairros Soteco e Ulisses Guimarães, ambos no município de Vila Velha, onde também foram observados cães com sorologia positiva para *R. bellii* (2 no bairro Ulisses Guimarães e 1 no bairro Soteco).

### 7.3.2. RIFI para *Ehrlichia canis*

Dos 312 cães, 71 (22,75%) tiveram sorologia positiva para *E. canis*. Destes, 47 (66,2%) eram provenientes da Grande Vitória e foram triados no Hospital veterinário da Universidade Vila Velha, 14 (19,7%) eram do município de Colatina, 8 (11,27%) do município de Alegre e 2 (2,82%) eram domiciliados em Santa Teresa. A soroprevalência para *E. canis* foi 23,15% (47/203) na Grande Vitória, 28,57% (14/49) em Colatina, 32% (8/25) em Alegre e 5,71% (2/35) em Santa Teresa.

### 7.4. Reação em Cadeia da Polimerase dos Carrapatos

Pools de Carrapatos de 48 animais, 100% identificados como *R. sanguineus* s.l. tiveram seu DNA extraído para realização de PCR para *Rickettsia* spp. Não houve resultados positivos na PCR para *Rickettsia* spp.

### 7.5. Sequenciamento

Na PCR para *Hepatozoon* (gene 18S rRNA) 39 amostras foram positivas e sequenciadas. Todos os produtos foram analisados, alinhados e submetidos ao BLAST. Todas as amostras obtiveram um fragmento de 574-pb com 100% de similaridade com *Hepatozoon canis* (Gene bank: U371447).

Na PCR para *Babesia* spp. (gene 18S), 5 amostras foram positivas. Todos os produtos foram sequenciados gerando um fragmento de 551-pb com 100% de similaridade com *Babesia canis vogeli* (Gene bank: KJ494656.1).

Das 378 amostras testadas na PCR para a família Anaplasmataceae (16S ribossomal), 34 foram positivos, sendo todas amostras sequenciadas e submetidas ao BLAST. Destas, 10 amostras geraram um fragmento de 307-pb com 100% de similaridade com *Ehrlichia canis* (GenBank: EF195134) e as outras 24 amostras geraram um fragmento de 306-pb com 100% de similaridade com *Anaplasma platys* (GenBank: T359590.1) (Tabela 3). A distribuição dos animais (cães e equinos) positivos para pelo menos um dos agentes é encontrada no mapa (Figura 6).

**Tabela 3.** Resultados dos sequenciamentos das amostras positivas na PCR

<b>Amostra</b>	<b>Pb (Identidade)-Gaps</b>	<b>Genbank</b>	<b>Referência</b>
Amostras para Babesia	498/498(100%)- 0/498(0%)	<i>Babesia canis vogeli</i> KJ494656.1	Rotondano et al., 2015
Amostras para Hepatozoon	553/553(100%)-0/553(0%)	<i>H.canis</i> GU371447	Gabrielli et al., 2010
Amostras ANAPLASMATACEAE (Indivíduos números 376, 157, 222, 257,248,295,324,345,355,361)	306/306(99%)-0/307(0%)	<i>Ehrlichia canis</i> EF195134.	Diniz et al., 2007
Demais amostras ANAPLASMATACEAE	306/306(100%)-0/306(0%)	<i>Anaplasma platys</i> KT359590.1	Kaewmongkol et al., 2015



## 8. DISCUSSÃO

A taxa de infestação por carrapatos nos animais deste estudo foi de 41,53% (157/378), estando de acordo com vários trabalhos no Brasil onde foi observada elevada frequência de ectoparasitismo em cães domiciliados e errantes, com destaque para os carrapatos (TORRES, FIGUEIREDO e FAUSTINO, 2004; CASTRO e RAFAEL, 2006; RODRIGUES, DAEMON e RODRIGUES, 2008; STALLIVIERE et al., 2009), representando até 82,77% dos ectoparasitos encontrados em cães (TORRES, FIGUEIREDO e FAUSTINO, 2004).

Do total de carrapatos coletados, 98,1% foram identificados como *R. sanguineus* s.l., 0,63% como *A. ovale* e 1,27% como *A. sculptum*. Esta última espécie, até pouco tempo, era classificada como *Amblyomma cajennense* (Martins et al., 2016).

A elevada prevalência de *R. sanguineus* s.l. no presente estudo está de acordo com vários outros realizados no Brasil. Em estudo realizado por Bellato et al. (2003), ao longo de um ano, no município de Lages, SC, foi verificada a prevalência de cães infestados por carrapatos de 52,8%. Já na pesquisa feita por Labruna et al. (2001) a prevalência de carrapatos nos cães de uma região rural no Norte do Paraná foi de 14,3%, sendo que a espécie de carrapato mais encontrada foi *R. sanguineus* s.l.. Oyafuso et al. (2002) relatou que em seu estudo feito em um Hospital Veterinário no Norte do Paraná, das 71 amostras de carrapato coletadas 4% foram identificadas como pertencente ao gênero *Amblyomma*, e 96% como *R. sanguineus* s.l.. Em uma região metropolitana de Recife, Torres, Figueiredo e Faustino (2004) constataram em seu estudo que 90% dos cães errantes e 73,8% dos cães domiciliados apresentavam o ectoparasito *R. sanguineus* s.l.. Castro e Rafael (2006) relataram que em sua pesquisa feita em Manaus, 80% dos animais eram acometidos por ectoparasitos, dentre eles 63% eram *R. sanguineus* s.l. Esta espécie é considerada, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (LABRUNA, 2004), além de ser a espécie mais encontrada em cães de áreas urbanas (RIBEIRO et al., 1997; OYAFUSO et al., 2002).

Espécies do gênero *Amblyomma* podem ser encontradas em cães que habitam áreas próximas a matas e florestas (LABRUNA et al., 2000), sendo *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma sculptum*, as espécies mais encontradas na região sudeste (MASSARD et al., 1981 apud LABRUNA, 2001; MARTINS et al., 2016), estando estes dados de acordo com os dados do presente estudo onde observou-se a presença de *A. sculptum* e *A. ovale* em área urbana próximo a fragmento de mata e em área rural respectivamente.

Neste estudo, *A. ovale* foi identificado pela primeira vez no estado do Espírito Santo, com o encontro deste carrapato em um cão no município de Santa Teresa (ACOSTA et al., 2016).

Todos os animais examinados tiveram sangue total coletados para a realização de exames moleculares onde foi observado 34 animais (9%) positivos para Anaplasmataceae, 28 animais (7,4%) positivos para *E. canis* pelo PCR real time, 5 animais (1,3%) positivos para *Babesia* sp. e 39 animais (10,31%) positivos para *Hepatozoon* sp. Estes resultados indicam que *Hepatozoon* sp. é o principal patógeno canino transmitido por carrapatos na área estudada.

Observou-se co-infecção com 2 ou 3 agentes em 22 animais (5,8%). Co-infecção por *Hepatozoon canis*, *E. canis* e *A. platys* foi observada em 3 animais, *Hepatozoon canis* e *A. platys* em 3 animais, *Hepatozoon canis* e *E. canis* em 2 animais, *E. canis* e *A. platys* em 11 animais e *E. canis* e *Babesia canis vogeli* em 1 animal. A co-infecção por agentes transmitidos por carrapatos em cães tem sido relatada por outros autores (SANTOS et al., 2009; RAMOS et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014) e ocorre devido ao fato dos agentes possuírem o mesmo vetor, o *R. sanguineus* s.l. (ROTONDANO et al., 2015), o qual também predominou neste estudo. Baneth et al. (2015) sugerem que a presença de um agente patogênico dentro de uma célula pode permitir ou facilitar a invasão celular ou sobrevivência prolongada do outro agente. De acordo com Sousa et al (2013), cães parasitados por carrapatos infectados por múltiplos agentes patogênicos podem ter uma evolução clínica desconhecida que depende da relação hospedeiro-parasita.

Anticorpos contra *E. canis* foram encontrados em 22,75% dos animais neste estudo. Uma prevalência similar foi previamente observada por Spolidorio et al. (2010) no Espírito Santo. Esta elevada prevalência é compatível com uma infecção prolongada e estimulação antigênica crônica (BARTSCH e GREENE, 1996), ou indicam que o número de animais expostos previamente a esta bactéria é superior aos casos de infecção ativa já que a soroprevalência observada foi superior aos resultados positivos encontrados pela PCR.

Em 19,55% (61/312) dos animais, anticorpos de *E. canis* foram detectados por RIFI na ausência de amplificação do DNA pelo PCR real time. Este resultado é esperado já que o teste sorológico não diferencia uma infecção ativa de uma exposição previa ao organismo (VIEIRA et al., 2011).

Dos 378 animais avaliados, 34 animais (9%) foram positivos na PCR para Anaplasmataceae, o qual revelou através do sequenciamento tratar-se de *E. canis* em 2,64% (10/34) e *Anaplasma platys* em 6,34% (24/34) dos cães através do sequenciamento do DNA.

A prevalência encontrada neste estudo para *E. canis* é menor que a observada por Spolidorio et al. (2010) tanto na área urbana quanto na área rural.

*Anaplasma platys* parasita preferencialmente plaquetas, resultando na Trombocitopenia Cíclica Canina (TROY et al., 1990). Infecções por *A. platys* e *E. canis* são comumente observadas nas mesmas regiões e a infecção por ambos organismos são frequentemente detectados no mesmo cão (DINIZ et al., 2010). Neste estudo a co-infecção por *E. canis* e *A. platys* foi observada em 3,7% (14/378) dos animais. *A. platys* tem sido identificada através de PCR em várias regiões do Brasil com prevalência variando entre 15,84% e 55% (FERREIRA et al., 2007; DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2009). Neste estudo a prevalência foi de 6,35% (24/378) dos cães avaliados.

Do total dos animais examinados, 1,3% (5/378) amplificaram *Babesia* spp na PCR o qual foi confirmado ser *Babesia canis vogeli* através do sequenciamento do DNA. Esta mesma espécie já havia sido relatada no Norte do Estado do Espírito Santo por Spolidorio et al. (2010), porém com prevalência muito superior ao do presente estudo (21,7%). Esta é a espécie de *Babesia* mais frequentemente observada em cães no Brasil (SOUSA et al., 2013) e transmitida por *R. sanguineus* s.l. (LEWIS et al., 1996), a espécie de carrapato mais observada parasitando os cães neste estudo.

Dos 312 cães submetidos a RIFI para identificação de anticorpos contra Rickettsias, 16 (5,13%) apresentaram títulos  $\geq 64$  para pelo menos uma espécie de Rickettsia das cinco testadas (Tabela 2). Destes, 5 (1,6%) apresentaram títulos  $\geq 64$  para *R. rickettsii*, sendo três de Vila Velha, um de Vitória e um de Santa Teresa. O cão de Santa Teresa é residente de área rural com acesso a mata. Um dos cães de Vila Velha reside na área rural (Retiro do Congo) com acesso a mata e possível contato com animais silvestres amplificadores de Rickettsias, como por exemplo gambás (*Didelphis* sp.) (PIRANDA, 2008) e coelhos do mato (*Sylvilagus brasiliensis*) (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935). Estes animais poderiam carrear carrapatos contaminados para o ambiente frequentado por este cão. Os outros três cães residiam em áreas urbanas, sendo um do bairro Itapuã em Vila Velha, outro no bairro Ulisses Guimarães em Vila Velha e outro do bairro Bento Ferreira em Vitória. Os cães residentes em Vila Velha nunca tiveram acesso a áreas rurais, contudo residem em casas em ruas onde o tráfego de carroças conduzidas por cavalos é intenso, podendo estes equinos serem carreadores de carrapatos contaminados para estas regiões. O cão residente em Vitória vai frequentemente a um sítio localizado na BR 101 Norte (Km 168 – Divisa entre os municípios de Linhares e Aracruz). A propriedade é cortada por um rio que é habitado por capivaras. Apesar do cão examinado não ter acesso a mata e áreas frequentadas pelas capivaras, consideradas

importantes amplificadoras de Rickettsias (Labruna, 2009), tem contato com vários outros cães residentes na propriedade que percorrem grandes distancias, inclusive áreas próximas ao rio e retornam para o peri-domicílio. Estes podem portanto serem os carreadores de carrapatos contaminados ao peri-domicílio. Contudo, esta área não é considerada endêmica para Febre Maculosa pois desde 2003 não há notificação de casos humanos à Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo (SINAN). Apesar destes resultados, não é possível afirmar que estes cinco animais supracitados tiveram contato com *R. rickettsii* pois na sorologia, a titulação não foi quatro vezes maior de outros antígenos.

Os títulos finais dos soros positivos variaram de 64 a 128 para *R. rickettsii* e *R. rhipicephali*, 64 a 256. Nos animais sororeativos não foi possível discriminar o agente porque os títulos encontrados foram semelhantes (diferença <4 vezes) para dois ou mais antígenos ou por terem um único título (64) para uma única espécie de *Rickettsia*. A presença de animais soropositivos neste estudo, apesar da baixa prevalência, assim como na pesquisa realizada por Spolidorio et al (2010) em cães no Norte do Estado do ES, sugere a circulação de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa em algumas das áreas estudadas nos últimos 6 a 18 meses (PIRANDA *et al.*, 2008), podendo o cão ser utilizado como sentinela em estudos de vigilância epidemiológica. O cão funciona como um ótimo sentinela onde o vetor da doença é o *A. aureolatum*, em áreas de *A. sculptum* o animal melhor sentinela é o cavalo (LEMOS *et al.*, 1997). Além de sentinelas, os cães são considerados hospedeiros amplificadores de carrapatos aumentando o número de vetores infectados no ambiente (RAOULT e PAROLA, 2007).

A baixa prevalência observada neste estudo faz com que as áreas estudadas não sejam consideradas áreas de risco para a Febre Maculosa Brasileira, pois neste caso, 50% dos animais deveriam ser positivos.

Além dos resultados obtidos nas amostras de cães, observou-se dois equinos com sorologia positiva para *R. bellii* com titulação de 1:64 e 1:128 residentes respectivamente nos bairros Soteco e Ulisses Guimarães, ambos no município de Vila Velha, onde também foram observados cães com sorologia positiva para *R. belli* (2 no bairro Ulisses Guimarães e 1 no bairro Soteco). Os resultados demonstram que há circulação de *Rickettsia* sp. nas regiões estudadas. No entanto, acredita-se que o risco de infecção humana seja baixo nestes locais do estudo devido a baixa prevalência encontrada.

Neste estudo, 39 animais (10,31%) amplificaram *Hepatozoon* sp. na PCR, o qual revelou através do sequenciamento tratar-se de *Hepatozoon canis*. Estando este dado de acordo com o descrito por Spolidorio (2009) e Gonçalves (2014) que afirmam que esta é a única espécie de *Hepatozoon* identificada em cães domésticos no Brasil. Este foi o agente

transmitido por carrapatos mais prevalente nos cães deste estudo. No Brasil, a transmissão de *H. canis* para cães de áreas urbanas tem sido associado ao *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (SPOLIDORIO et al., 2009, MIRANDA et al., 2014), espécie de carrapato mais prevalente neste estudo. Este resultado indica que *R. sanguineus* s.l. é o possível vetor de *H. canis* no Espírito Santo, assim como foi sugerido por Spolidorio et al. (2009). Ainda de acordo com Spolidorio et al. (2009), a Hepatozoonose canina causada por *H. canis* parece ser uma infecção que ocorre frequentemente em áreas onde o *R. sanguineus* s.l. é endêmico. Em estudo realizado no norte do Estado do Espírito Santo, observou-se, através de resultados moleculares, quantidade significativa (58,7%) de cães infectados por *Hepatozoon*, concluindo tratar-se de uma área endêmica para Hepatozoonose Canina (SPOLIDORIO et al., 2009).

Dos 39 animais positivos para *Hepatozoon canis*, apenas 4 (10,25%) eram sintomáticos. Assim, o presente estudo mostrou que a infecção canina por *H. canis* é comum em cães aparentemente saudáveis no Estado do Espírito Santo, assim como relatado previamente por Spolidorio et al. (2009) e Paludo et al. (2005) que afirma que a doença é geralmente inaparente e subclínica.

## 9. CONCLUSÃO

- O carrapato mais comumente encontrado em cães nos municípios estudados é o *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

- O encontro de *A. ovale* no município de Santa Teresa é o primeiro registro deste carrapato no estado do Espírito Santo.

- Os agentes transmitidos por carrapatos observados circulando na população canina, são *E. canis*, *A. platys*, *B. canis vogeli*, *H. canis*, e *Rickettsia* sp. do grupo da febre maculosa.

- A maioria dos cães infectados com *H. canis* eram aparentemente saudáveis, assim patogenicidade de *H. canis* para cães no ES permanece desconhecida. São necessários mais estudos para identificar a relevância clínica deste protozoário na região.

- Observou-se presença de equinos com sorologia positiva para *R. bellii* residentes em regiões onde também foram observados cães com sorologia positiva para *R. bellii*, demonstrando que há circulação de *Rickettsia* sp. nas regiões estudadas. No entanto, acredita-se que o risco de infecção humana seja baixo nestes locais do estudo devido a baixa prevalência encontrada.

- Nossos resultados são importantes para o conhecimento da distribuição destes patógenos nos municípios estudados, com vistas ao seu diagnóstico e controle na população animal, além de servirem como um alerta para a potencial ocorrência de casos humanos nestas regiões.

## **10. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Estudos sorológicos dos donos e contatos domiciliares de cães infectados com alguns destes patógenos poderão subsidiar informações sobre o papel do cão como carreador de agentes patogênicos transmitidos pelo carrapato à população humana dos municípios estudados.

## 11. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I.C.L.; MARTINS, T.F.; MARCILI, A.; SOARES, H.S.; KRAWCZAK, F.S.; VIEIRA, F.T.; LABRUNA, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from humans, domestic and wild animals in the state of Espírito Santo, Brazil, with notes on rickettsial infection. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 3-4, p. 66-69, 2016.
- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) ticks from Brazil. **J. Med. Entomol.**, 44:126-132, 2007.
- AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. In: Vitro Isolation and Molecular Characterization of *Ehrlichia canis* strain from Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:489-493, 2008.
- AKTAS, M.; OZUBEKI, S.; ALTAY, K.; IPEK, N.D.S; BALKAYA, I.; UTUK, A.E.; KIRBAS, A.; SIMSEK, S.; DUMANL, N. Molecular detection of tick-born rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. **Parasite Vectors**, 8:157, 2015.
- ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia* spp. no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, 12:11-29, 1983.
- ALMEIDA, A.P. Survey of Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia Hepatozoon and Leishmania in free-living crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). In: **the State of Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; PAULA, D.A.J.; DAHROUG, M.A.A.; FREITAS, A.G.; SILVA, J. N.; DUTRA, A.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R.F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 3, p. 1123-1126, maio/jun. 2012.
- ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; VARGAS, G.H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A.R.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; MACHADO, R.L. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**; 173 (1-2): 134-138; 2010.
- ANGERAMI, R.N., RESENDE, M. A., FELTRIN, A.F.C., KATZ, G., NASCIMENTO, E.M.;STUCCHI,R.S.B.; SILVA, L.J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil. **Ann N Y Acad Sci**.1078:252–254, 2006.
- APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W.L.; MEAD, D.G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M.J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, W.D. Tick-borne diseases in North Carolina: is “*Rickettsia amblyommii*” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? **Vector –Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.5, p.597-606, 2008.

ARRAGA-ALARADO, C.M.; QUROLLO, B.A.; PARRA, O.C.; BERRUETA, M.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **Am J Trop Med HYG** 91:1161-1165, 2014.

BANETH, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; AROCH, I.; SHKAP, V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **J Parasitol**; 87(3); 606-611, 2001.

BANETH, G.; HARRUS, S.; GAL, A.; AROCH, I. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. **Veterinary Parasitology**, 208(1-2):30-4, 2015.

BARROS-BATTESTI, D.M. Introdução. In: 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, 2006.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **J. Vet. Intern Med**, 10(4):271-274, 1996.

BEUGNER, F.; MARIÉ, J.L. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. **Veterinary Parasitology**.; 163 (4):298-305; 2009.

\_\_\_\_\_. Boletim eletrônico epidemiológico. SVS/MS. Ano 10. n° 2, abril 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_eletronico\\_02\\_ano10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf)>. Acesso em 29/10/2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Tabela de casos confirmados de febre maculosa. **Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 2007 a 2015**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/febremaculosaes.def> acesso em: 01/07/2017.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p. 2645-2651, 1998.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; QUROLLO, BA, SAITO, TB, MAGGI, R.G.; BLANTON, L.S.; BOYER, D.H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasit Vectors**, 7:298, 2014.

BRITO, L.G., SILVA NETTO, F.G., OLIVEIRA, M.C.S., BARBIERI, F.S. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Porto Velho: Embrapa Rondônia**, p.21, 2006.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.B.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R.C.; WALKER, D.H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8(3):259-262, 2004.

CASTRO, M.C.M.; RAFAEL, J.A. Ectoparasitos de cães e gatos da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, vol.36 (4), 535-538, 2006.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v.33, p. 863-884, 2003.

COSTA, P.S.G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. More About Human Monocytotropic in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 10(1):7-10, 2006.

CRAIG, T.M. Hepatozoonosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p.458-465.

CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.L.; LEMOS, E.R.S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(2): 105-108, fevereiro, 2009.

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

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, p.20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A. Canine Babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, n.141. p.197-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39 (1):64-67, jan-fev, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet. Parasitol.** 152, 173 – 185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, Keele University, v. 1, n. 1, p. 25-42, 2008b.

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

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, 3:26, P. 3 -11, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; GIANELLI, A.; OTRANTO, D. Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, 185, p.260-264, 2012.

DEL FIOL, F.S.; JUNQUEIRA, F.M.; ROCHA, M.C.P.; TOLEDO, M.I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panam Salud Publica**, 27 (6):461-6, 2010.

DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.S.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.; EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.Jr.; ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERDLOW, D.L.; MCQUISTON, J.H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **N Engl J Med** 2005, 353:587-594.

DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil. **A. J. Trop. Med.**, 19:103-108, 1939.

DINIZ, P.P.V.P.; SCHWARTZ, D.S.; MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, n 4, p. 1-9, 2007.

DINIZ, P.P.V.P.; BEALL, M.J.; OMARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.A.; Cyr, K.E.; KOTERSKI, J.F.; ROBBINS, R.G.; LALO, P.G.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in Northeastern Arizona. **Vector Borne Zoonotic Disease**. v.10, p.117-23, 2010.

DOTTI, J. **Terapia e animais**. 1ª ed. São Paulo: Editora Noética, 2005.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p504-510, 2005.

DUNCAN, A.W.; CORREA, M.T.; LEVINE, J.F.; BREITSCHWERDT, E.B. The dog as a sentinel for human infection: prevalence of *Borrelia burgdorferi* C6 antibodies in dogs from southeastern and mild- Atlantic staes. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 4:221, 2004.

FERNANDES, F.F. Atividade *in vitro* de permetrina, cipermetrina e deltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 621 – 626, 2000.

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

FIGUEIREDO, L.T.M., BADRA, S.J., PEREIRA, L.E., SZABÓ, M.P.J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32(6): 613-619, nov-dez, 1999.

FORLANO, M.D.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. In *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, vol. 134(1), p.1-7, 2005.

FORLANO, M.D.; TEIXEIRA, K.R.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO, K.S.; FERNANDES, K.R.; LINHARES, G.F.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Veterinary Parasitology**, 145:21-30.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Bergeys's Manual of systematic of bacteriology**. 2. Ed Baltimore: Williams & Wilkins, 2004.

GEORGE, F., BROUQUI, P., BOFFA, M.C., MUTIN, M., DRANCOURT, M., BRISSON, C. Demonstration of *Rickettsia conorii*-induced endothelial cell injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. **Blood**, 82(7):2109-16, 1993.

GONÇALVES, L.R.; FILGUEIRA, K.D.; AHID, S.M.M.; PEREIRA, J.S.; do VALE, A.M.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.407-412, jul-set, 2014.

GREENE, C.E.; BREITSCHWERDT, E.B. Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever. In: Greene, E.C. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3<sup>o</sup> ed. Elsevier, p.232-245, 2006.

GROVES, M.G.; HARRINGTON, K.S.; TABOADA, J. Questões frequentes sobre zoonoses. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.402-429, 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.W.; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajenense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 100(8):841-845, december, 2005.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A.J.; BARROS-BATESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; MARTINS, J.R.; VENZAL, J.M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J.E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Kock, 1844: hosts, distribution and 16S r DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, 113:273-288, 2003.

GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; SZABO, M.J.P.; MARTINS, J.R.; GONZALEZ ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp Appl Acarol**, 40:83-100, 2006.

GURGEL, C.B.F.M.; COUTINHO, E.R.; FAVORITTO, P.C.; RAMOS, F.; PROQUERE, L.P.; MAGDALENA, C.V.; Prioli, L.F. Investigações das riquetsioses: contribuições de cientistas brasileiros. **Rev. Bras Clin Med**, 7: 256-260, 2009.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M.T. Entomology in Human and Animal Health. Seventh Edition. Macmillan Publishin Co., New York, 548 p., 1979.

HOMER, M.J.; AGUILAR –DELFIN, J.; TELFORD, SR 3rd; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. BABESIOSIS. *Clin Microbiol Rev.*, Jul; 13(3): 451-459, 2000.

IRWIN, P.J. Canine Babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasite & Vectors*, v.2, p. S4, Supplement 1, 2009.

KOTTON, C.N. Zoonoses from dogs. **UpToDate on line 17.1**, dez, 2008.

LABRUNA, M.B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.S.; PACHECO, R.C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.5, p.553-556, 2001a.

LABRUNA, M. B. Bioecologia de *Rhipicephalus sanguineus*. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 123-124, 2004. Supplement.

LABRUNA, MB. Cultivo celular de riquetsias no Brasil. *In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinaria e II Simposio Latino-Americano de Rickettsioses*, 2006, Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: CBPV: Programas e Resumos; p.132-133, 2006.

LABRUNA, M.B.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B. Ticks (Acari:Ixodidae) associated with rural dogs in Uruara, Eastern Amazon-Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.37, p.774-776, 2000.

LABRUNA, M.B.; JORGE, R.S.; SANA, D.A.; JÁCOMO, A.T.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; FERRO, C.; PEREZ, S.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T.S.Jr; MARQUES, S.R.; MORATO, R.G.; NAVA, A.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.; GOMES, A.A.; CONFORTI, V.A.; AZEVEDO, FC.; PRADA, C.S.; SILVA, J.C.; BATISTA, A.F.; MARVULO, M.F.; MORATO, R.L.; ALHO; C.J.; PINTER, A.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, F.BARROS BATTESTI, D.M. Tickes (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Exp Appl Acarol*, 36:149-163, 2005a.

LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, vol.15 (3), marc 2009.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.; GENNARI, S.M.; Seasonal dynamics of Ticks (Acari:Ixodidae) on horses in the State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 105(1):65-77, 2002.

LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; De WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 97:1-14.

LABRUNA, M.B., MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. *In: BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. Carrapatos de Importância Medico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo, Vox/ ICTTD-3/ Butantan, 2006.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A.; AGUIAR, D.M.; YABSLEY, M.J.; DAVIDSON, W.R.; STROMDAHL, E.Y.; WILLIAMSON, P.C.; STICH, R.W.; LONG, S.W.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.143, p.189-195, 2007.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.30, p.24-32. 2001.

LABRUNA, M.B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES Jr., J.S.; PACHECO, R.C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n. 5, p.553-556, 2001.

LABRUNA, M.B.; Whitworth, T.; HORTA, M.; 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.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABÓ, M.P.J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia belli* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, feb., p.869-873, 2007.

LABRUNA MB, MATTAR S, NAVA S, BERMUDEZ S, VENZAL, JM, DOLZ G, et al. Rickettsioses in: Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Rev MVZ Cordoba**; 16(2): 2435-2457, 2011.

LABRUNA, M.B. **Ecology of Rickettsia in South America**. Annals of the New York Academy of Science, v.1166, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; TERRASSINI, F.A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T.T.; CAMARGO, E.P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Syst Appl Acarol**, 10:17-32, 2005b.

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

LAPPIN, M.R. Doenças Infecciosas. In: NELSON, R.W ; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais** – 5. ed.- Rio de Janeiro: Elsevier, cp. 96, p. 1369-1370, 2015.

LEDER, K.; WELLER, P.F. Epidemiology and pathogenesis of babesiosis. **UpToDate on line 17.1**, janeiro, 2009.

LEMONS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; SERRA-FREIRE, N.M.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30:181-185.

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

LI, Y.; WANG, C.; ALLEN, K.E.; LITTLE, S.E.; AHLUWALIA, S.K.; GAO, D.; MACINTIRE, D.K.; BLAGBURN, B.L.; KALTENBOECK, B. Diagnosis of Canine Hepatozoon spp. Infection by quantitative PCR. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.50-58, 2008.

MARTINS, T.F.; BARBIERI, A.R.; COSTA, F.B.; TERASSINI, F.A.; CAMARGO, L.M.; PETERKA, C.R.; de C. Pacheco, R.; DIAS, R.A.; NUNES, P.H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A.K.; HORTA, M.C.; GUILLOUX, A.G.; BENATTI, H.R.; RAMIREZ, D.G.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasit Vectors**. 9(1):186, 2016.

MIRANDA, R.L.; de Castro, J.R.; OLEGÁRIO, M.M.M.; BELETTI, M.E.; MUNDIM, A.V.; O'DWYER, L.H.; EYALD, O.; TALMI-FRANKD, D.; CURYA, M.C.; BANETHD, G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**; 177(3-4):392-396, 2011.

MIRANDA, R.L.; O'DWYER, L.H.; de Castro, J.R.; METZGER, B.; RUBINI, A.S.; MUNDIM, A.V.; EYAL, O.; TALMI-FRANK, D.; CURY, M.C.; BANETH, G. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural áreas in Southeast Brazil. **Res Vet Sci**, 97(2); 325-328, 2014.

MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. ; PACHECO, R.; LABRUNA, M. B. . Pesquisa de anticorpos anti - *Rickettsia rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ/SP). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 85-91, 2009 a.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; GUTMANN, T.B.; BARBOSA, S.O.; GONZÁLES, M.A.R.M.; MURARO, M.A., CECÍLIO, S.R.M.; LABRUNA, M.B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v.9, p.73-78, 2009.

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

MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Thypho exantematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**. v.19, p.465-470, 1935.

NEER, M.T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection. In: Greene, E.C. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3º ed. St Louis: Elsevier, p.203- 216, 2006.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L. Aspectos gerais da Hepatozoonose canina. **Clínica Veterinária**, v.31, p.34-40, 2001.

OLIVER, Jr., J.H. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). **Review of Ecology and Systematics**, v.20, p.397-430, 1989.

ONOFRIO, V.C., VENZAL, J.M., PINTER, A., SZABÓ, M.P.J. In: BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Medico-Veterinária da Região Neotropical**: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/ Butantan, 2006.

OYAFUSO, M.K.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H.S.A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p.71-74, jan/jun. 2002.

PACHECO, R.C.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia belli* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brasil. **Revista Mvz Cordoba**, vol.13(2), P. 1273, 2008.

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; NARDI, M.S.; SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; SZABÓ, M.P.J.; 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** 42(3):351-353, mai-jun, 2009.

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

PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, S. R.; CHILDS, J. E. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 197-199, 2002.

PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W.; COMER, J.A.; Zaki, S.R.; GOLDSMITH, C.S.; GODDARD, J. Mclellan, S.L.F.; TAMMINGA, C.L.; OHL, C.A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin Infect Dis** ; 38:805-811; 2004.

PAGANO, M.; GRAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

PALUDO, G.R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A.; MACINTIRE, D.K.; WHITLEY, E.M.; Boudreaux, .K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B.L.; DYKSTRA, C.C. Hepatozoon spp. pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitol. Res.** 97, 167-170, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick Borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p. 719-756, 2005.

PAROLA, P.; ROUX, V.; CAMICAS, J.L.; BARADJI, I.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** v.94, p.707-708, 2000.

PASSOS, L.M.F., GEIGER, S.M., RIBEIRO, M.F.B., PFISTER, K., ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 81-85, 2005.

PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Clínica Veterinária**, v. 12, p. 19-23, 1998.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; Wen, B. *Ehrlichia canis*-like Agent Isolated from a man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, sept., p. 2133-2139, 1996.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann N Y Acad Sci**; 1078:110-117, 2006.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE, 2013. Disponível em : <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf> . Acesso em : 20 de junho de 2017.

PETERKOVÁ, K.; VANCOVÁ, I.; HAJNICKÁ, V.; SLOVÁK, M. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v.22, p.167-171, 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsia* and *Rickettsia belli* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann NY Acad Sci**, 1078:523-529, 2006.

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 State of Sao Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(2):247-252, fev., 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. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, vol.103 (7):696-701, November, 2008.

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

RAMOS, C.A.N., RAMOS, R.A.N., ARAÚJO, F.R., GUEDES JR, D.S., SOUZA, I.I.F., ONO, T.M. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.18, p.58-62, 2009.

- RAMOS, R.; RAOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitol Res**, 107(5):1115-1120, 2010.
- RAMOS, C.A.N.; BABO- TERRA, V.J.; PEDROSO, T.C.; SOUSA FILHO, A.F.; ARAÚJO, F.R.; CLEVELAND, H.P.K. Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.247-250, abr-jun, 2015.
- RANDOLPH, S.E.; CRAINE, N.G. General Framework for Comparative Quantitative Studies on Transmission of Tick-Borne Diseases Using Lyme Borreliosis in Europe as an Example. **Entomological Society of America**, v.32, p.765-777, 1995.
- RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial Diseases**. New York London: CRC Press, 2007.
- REGNARY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portion of two Rickettsial gene. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.1576-1589, 1991.
- RIBEIRO, V.L.S.; WEBER, M.A.; FETZER, L.O. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, p.285-289, 1997.
- RODRIGUES, D.F.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A.F.S.F. Caracterização da população de ectoparasitos de cães de núcleos de expansão urbanas de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Vet.** 17, 4, 185-188, 2008.
- ROTONDANO, T.E.F.; ALMEIDA, H.K.A.; KRAWCZAK, F.S.; SANTANA, V.L.; VIDAL, I.F.; LABRUNA, M.B.; AZEVEDO, S.S.; ALMEIDA, A.M.P.; MELO, M.A. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. And *Hepatozoon* spp. In dogs from a semiarid region of Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 24, n.1, p.52-58, jan-mar., 2015.
- SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.B.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, M.A.M; SCHUMAKER, T.T.S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**., v.11, n.2, p.265-270, 2005.
- 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**, 179: 145-148, 2009.
- SARAIVA, D.G.; SOARES, H.S.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. Feeding Period Required by *Amblyomma aureolatum* Ticks for Transmission of *Rickettsia rickettsia* to Vertebrate Hosts. **Emerging Infectious Diseases**, vol.20, n9, September, 2014.
- SERRA-FREIRE, N.M. Occurrence of ticks (Acari:Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Para, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Vet.** Jul-Sep; 19(3):141-7, 2010.

SILVA, A.B.; Duarte, M.M.; da Costa Cavalcante, R.; de Oliveira, S.V.; Vizzoni, V.F.; DE LIMA DURÉ, A.L.; DE MELO IANI, F.C.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G.S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Trop.** May, 20; 173:30-33, 2017.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R.C.; SZABÓ, M.P.J.; RAMOS, H.G.C; LABRUNA, M.B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerg Infect Dis**; 13:1111-1113; 2007.

SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> acesso em: 17/08/2014.

SMITH, T.G. The genus Hepatozoon (Apiconplexa: Adeleina). **J Parasitol**; 82(4):565-585; 1996.

SOARES JF, SOARES HS, BARBIERI AM, LABRUNA MB. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Med Vet Entomol** ; 26(2): 139-151; 2012.

SOARES, R.; RAMOS, C.A.; PEDROSO, T.; BABO-TERRA, V.; CLEVELAND, H.; ARAÚJO, F. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89(1): 301-306, 2017.

SOUSA, K.C.; ANDRÉ, M.R.; HERRERA, H.M.; ANDRADE, G.B.; JUSI, M.M.G.; SANTOS, L.L.; BARRETO, W.T.G.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, G.P. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 22(4):525-531, 2013.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; Zago, A.M.; DONATELE, D.M.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.4, p.357-361, 2009.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI, N.H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.3, p.521-523, 2010a.

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 State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 83(1), p.201-206, 2010.

SPOLIDORIO, M.G.; TORRES, M.M.; CAMPOS, W.N.; MELO, A.L.; IGARASHI, M.; AMUDE, A.M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20(3):253-255, 2011.

STALLIVIERE, F.M.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; MOURA, A.B.; NEIDERMAIER, L. Ectoparasitos em *Canis familiaris* da cidade de Lages, SC, Brasil e

aspectos sócio- econômicos e culturais das famílias dos proprietários dos animais. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, v.2, p.179-183, 2009.

STROMDAHL, E.Y.; VINCE, M.A.; BILLINGSLEY, P.M.; DOBBS, N.A.; WILLIAMSON, P.C. *Rickettsia amblyommi* infecting *Amblyomma americanum* larvae. **Vector Borne and zoonotic Diseases**, v.8, p.15-24, 2008.

SZABO, M.P.; NIERI-BASTOS, F.A.; SPOLIDORIO M.G.; MARTINS .F.; BARBIERI A.M.; LABRUNA M.B. In vitro iso- lation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology** 140:719–728, 2013.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In: In: GREENE, E.C. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3º ed. Elsevier, p.722- 736, 2006.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 356:983-989, 2001.

TOLEDO, R.S., TAMEKUNI, K., HAYDU, V.B., VIDOTTO, O. Dinâmica sazonal de carrapatos do gênero *Amblyomma* (ACARI: IXODIDAE) em um parque urbano da cidade de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, supl. 1, p.50-54, 2008.

TORRES, F.D.; FIGUEIREDO, 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** , Vet., 13, 4, 151-154, 2004.

TROY, G.C.; VULGAMOTT, J.C.; TURNWALD, G.H. Canine Ehrlichiosis: A Retrospective Study of 30 Naturally Occurring Cases. **Journal of American Animal Hospital Association**. v.16, p.181-187, 1990.

UENO, T.E.H. COSTA, F.B., MORAES-FILHO, J., AGOSTINHO, W.C., FERNANDES, W.R., LABRUNA, M.B. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. **Parasites & Vectors**, 9:499, 2016.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**, Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p 306, 1990.

VIEIRA, A.M.L.; SOUZA, C.E.; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C.; SOUZA, S.S.L.; CAMARGO-NEVES, V.L.F. Manual de Vigilância Acarológica Estado de São Paulo. Secretaris de Estado da Saúde, São Paulo, p.62.

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