UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

INTERAÇÃO DE HEMOPARASITOS E HEMOPARASITOSES EM CASOS CLÍNICOS DE TROMBOCITOPENIA EM CÃES NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA

Hérika Xavier da Costa
Orientador: Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

GOIÂNIA
2011

UFG

sistema de bibliotecas ufg

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Herika Xavier da Costa** E-mail: **herika.gyn@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não

Vínculo Empregatício do autor: **AGENCIA GOIANA DE DEFESA AGROPECUÁRIA**

Agência de fomento:

País: **BRASIL** UF:**GO** CNPJ: **06.064.227/0001-87** Sigla: **AGRODEFESA**

Título: Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de goiânia Palavras-chave: **Alterações hematológicas, A. platys, B. c. vogeli, E. canis, H. canis e M. haemocanis**

Título em outra língua: **Interaction of hemoparasites and hemoparasitoses in clinical cases of thrombocytopenia in dogs in the city of Goiânia**

Palavras-chave em outra língua: **Hematological changes, A. platys, B. c. vogeli, E. canis, H. canis and M. haemocanis**

Área de concentração: **Sanidade Animal e Higiene e Tecnologia de Alimentos**

Data defesa: (dd/mm/aaaa) **25/02/2011**

Programa de Pós-Graduação:**Ciência Animal**

Orientador(a):**Guido Fontgalland Coelho Linhares** E-mail: **guidofcl@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Adilson Donizeti Damasceno** E-mail: addamasceno@vet.ufg.br

Co-orientador(2): **Valéria de Sá Jayme** E-mail: **valeria.mg@uol.com.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique:

[ ] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 9 de junho de 2011

Herika Xavier da Costa

Assinatura do(a) autor(a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

HÉRIKA XAVIER DA COSTA

INTERAÇÃO DE HEMOPARASITOS E HEMOPARASITOSES EM CASOS CLÍNICOS DE TROMBOCITOPENIA EM CÃES NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal e Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:
Prof. Dr. Guido Fontgalland C. Linhares
Comitê de Orientação:
Dr. Adilson Donizeti Damasceno
Dra. Valéria de Sá Jayme

GOIÂNIA
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

Costa, Herika Xavier da.
C837i Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia [manuscrito] / Herika Xavier da Costa. – 2011.
70 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas e tabelas.

1. Hemoparasitos caninos – Diagnóstico – Goiás (Estado). 2. *Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Mycoplasma* – Caninos. 3. Doenças infecciosas e trombocitopenia. I. Título.

CDU: 636.09(817.3)

HERIKA XAVIER DA COSTA

Dissertação defendida e aprovada em **25/02/2011**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares
(ORIENTADOR (A))

Prof. Dr. Carlos Luiz Massard - UFRRJ/RJ

Profa. Dra. Sabrina Castilho Duarte - Bolsista CNPq.

Dedico aos meus pais, Arcidino e Maria Bernadete, base da minha formação, orientadores do meu caráter e meus primeiros professores. Com eles aprendi o valor e a importância do conhecimento, e a eles dedico os frutos que este aprendizado produziu em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo milagre da vida e por ter colocado em meu caminho pessoas incríveis e admiráveis. Aos meus pais, Maria Bernadete e Arcidino, pelo imenso sacrifício que tiveram que passar para me proporcionar um estudo de qualidade e pela paciência que tiveram que ter para suportar minha personalidade forte. Os senhores são meu orgulho e meu exemplo. Se hoje eu consegui realizar os meus sonhos foi porque me guiaram e me ofereceram todos os ingredientes necessários para alcançar o sucesso. Não fiz nada além da minha obrigação de honrar tudo que me foi oferecido.

Aos residentes, técnicos de laboratório, diretoria e todos os funcionários do hospital veterinário pela imensa disponibilidade em ajudar a coletar as amostras e os dados necessários para a realização do presente estudo.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Guido F. C. Linhares pela imensa paciência e incrível competência. Eu te admiro muito e lhe tenho como um exemplo de excelente profissional. Não tenho palavras para expressar o carinho que lhe dedico. Agradeço todos os dias por tê-lo como orientador.O senhor é uma grande pessoa. Me ajudou a crescer não só profissionalmente mas também como pessoa.Sempre me espelharei no seu caráter e honestidade.

Á minha amiga Sabrina por ter me oferecido sua ajuda, seu carinho e seu ombro amigo. A sua ajuda foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho. Você é um dos anjos que Deus colocou na minha vida. Seu futuro será brilhante assim como você.

Ao meu irmão Heitor e aos meus grandes amigos Carlos Eduardo, Brunno Roberto, Cairo, Tayrel, Webber, Hilari, Pollyanna Fernandes, Pollyanna Ingrid, Williane, Nayra, Gisleni e Cynthia pela ajuda, imensa paciência e compreensão. Agradeço por vocês entenderem o motivo das minhas ausências em diversas reuniões da turma.

Ao CNPQ por apoiar meu aperfeiçoamento profissional me concedendo uma bolsa de mestrado.

Á Universidade Federal de Goiás (UFG), que possibilitou a minha formação acadêmica e abriu as portas para meu ingresso na pós graduação.

Agradeço a todos os funcionários da UFG por serem tão prestativos e acolhedores.

Aos professores Adilson Damasceno e Valéria de Sá Jayme por terem contribuído para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Emmanuel Arnhold por ter auxiliado na tabulação dos resultados e na aplicação da estatística.

A professora Dra. Joanne Belle Messick da Universidade de Purdue (West Lafayette/EUA) por ceder de forma tão solícita e amiga o controle positivo de *Mycoplasma haemocanis* utilizados neste estudo, e a Dra Andrea Santos por ter intermediado o processo de aquisição do DNA de referência para *M. haemocanis*, o apoio e parceria foram essenciais para o estudo.

Agradeço imensamente a professora Maria Auxiliadora de Andrade, pelo apoio e carinho dedicado. Saiba que não tenho palavras para descrever o que a senhora representa na minha vida.

Aos cães que participaram desta pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria completa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuiram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”.
Albert Einstein

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 1
2.REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1 Erliquiose canina 4
2.2 Trombocitopenia cíclica infecciosa canina 8
2.3 Babesiose canina 12
2.4 Hepatozoonose canina 15
2.5 Micoplasmose canina 19
2.6 Trombocitopenia 22
3. OBJETIVOS 25
3.1 Objetivo geral 25
3.2 Objetivos específicos 25
4. MATERIAL E MÉTODOS 26
4.1 Local e período de realização 26
4.2 Grupo de cães utilizados no estudo 26
4.4 Colheita de material 27
4.5 Exame parasitológico direto: 27
4.5 Extração do DNA genômico das amostras 27
4.6 Execução da técnica de PCR 27
4.6.1 Reação de PCR para *Babesia* spp 28
4.6.2 Reação de PCR para *E. canis* 30
4.6.3 Reação de PCR para *A. platys* 30
4.6.4 Reação de PCR para *H. canis* 31
4.6.5 Reação de PCR para *M. haemocanis* 32
4.7 Leitura e documentação da reações de PCR 33
4.8 Análise estatística 33
5. RESULTADOS 34
5.1 Exame parasitológico direto 34
5.2 Testes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 35
5.3 Relação entre infecções por *Ehrlichia canis* e intervalos de plaquetometria em animais trombocitopênicos 37
5.4 Exame parasitológico direto x PCR 39
5.5 Infecções associadas entre *Ehrlichia canis* e outros hemoparasitos 40
6. DISCUSSÃO 42
7. CONCLUSÕES 47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência (%) da infecção por hemoparasitos identificadas pela PCR em cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos atendidos no HV/EV/UFG da cidade de Goiânia. 36

Figura 2. Ocorrência de infecção mista entre os hemoparasitos avaliados em cães atendidos no HV/EV/UFG na cidade de Goiânia. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de infecção por hemoparasitos em cães trombocitopênicos (n=150) e não trombocitopênicos (n=150) atendidos no HV/EV/UFG e avaliados pelo exame parasitológico direto. 34

Tabela 2. Frequência de infecção por hemoparasitos em cães trombocitopênicos (n=150) e não trombocitopênicos (n=150) atendidos no HV/EV/UFG e avaliados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). 35

Tabela 3. Relação estatística dos resultados PCR-positivos para *E. canis* dentro do grupo de animais trombocitopênicos, analisando-se diferentes faixas de plaquetometria..... 38

Tabela 4. Comparação da eficiência entre os Métodos de diagnóstico empregados: exame parasitológico direto e PCR, utilizando como análise estatística o teste de McNemar 39

Tabela 5. Ocorrência de infecções mistas por hemoparasitos em cães trombocitopênicos (n=150) e não trombocitopênicos (n=150) no HV/EV/UFG, na cidade de Goiânia, através da PCR. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

ºC	*Graus Celsius*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeo
LDDP	Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias
$MgCL_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
Ta	Temperatura de anelamento
Taq	*Thermus aquaticus*
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultra-violeta

RESUMO

Os principais hemoparasitos de importância na clínica de cães estão, frequentemente, relacionados com a manifestação de trombocitopenia, a qual é caracterizada por uma diminuição no número de plaquetas. Objetivou-se com este trabalho verificar o envolvimento de hemoparasitos nos achados de trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás. Para o estudo foram selecionados 300 animais, divididos em dois grupos de 150, sendo um grupo de animais trombocitopênicos (<200.000 plaquetas/mm^3) e outro grupo representado por animais não-trombocitopênicos (≥200.000 plaquetas/mm^3). Foram coletadas amostras de sangue com EDTA dos dois grupos para a extração de DNA total. Os eluatos de DNA foram, todos, submetidos a testes de PCR para a detecção específica de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma canis*, *Hepatozoon canis*, *Mycoplasma haemocanis*, *Babesia canis vogeli, Babesia gibsoni* e *Theileria equi*. A frequência de amostras positivas entre o grupo de animais trombocitopênicos foi de 71,3% (107/150) para *E. canis*, 8,7% (13/150) para *A. platys*, 9,3% para *B. c. vogeli* (14/150), 2,0% (3/150) para *H. canis* e 3,3% (5/150) para *M. haemocanis*. No grupo de não-trombocitopênicos a frequência de positivos foram de 14% (21/150) para *E. canis*, 3,3% (5/150) para *A. platys*, 0,7% (1/150) para *B. c. vogeli*, 4,0% (6/150) para *H. canis* e 1,3% (2/150) para *M. haemocanis*. *Babesia gibsoni* e *Theileria equi* não foram detectadas usando ensaios de PCR. Associações estatisticamente significativas entre casos de trombocitopenia e infecções por hemoparasitos foram observadas apenas para *E. canis* ($P<0,05$) e *B. c. vogeli* ($P<0,05$). A hemoparasitose de maior frequência foi a Erliquiose Monocitica Canina, ocorrendo em 71,33% (107/150) no grupo de cães trombocitopênicos e em 14% (21/150) do grupo de cães não trombocitopênicos. Verificou-se uma relação entre o grau de trombocitopenia e a infecção por *E. canis*. Valores de trombocitopenia severa (<50.000 plaquetas/mm^3 de sangue) demonstrou ser um indicador de infecção por *E. canis.*

Palavras chaves: Alterações hematológicas*, A. platys, B. c. vogeli, E. canis, H. canis* e *M. haemocanis.*

ABSTRACT

The most important hemoparasites in dogs clinic are often associated with the manifestation of thrombocytopenia, being characterized by a lowering in platelet numbers. The aim of the current study was to verify the involvement of hemoparasites in finding thrombocytopenia in dogs from the city of Goiânia treated at the Veterinary Hospital of Federal University of Goiás (HV/EV/UFG). For this study, 300 animals were selected and divided into two groups: one group with 150 animals with thrombocytopenia (< 200.000 platelets/mm^3) and another one with 150 non-thrombocytopenic animals (≥ 200.000 platelets/mm^3). Blood samples with EDTA were collected in the two groups for total DNA extraction. All DNA eluates were tested by PCR for specific detection of *Ehrlichia canis, Anaplasma canis, Hepatozoon canis, Mycoplasma haemocanis, Babesia canis vogeli, Babesia gibsoni* and *Theileria equi*. The frequency of positive samples within the group of thrombocytopenic animals was 71.3% (107/150) to *E. canis*, 8.7% (13/150) for *A. platys*, 9.3% for *B. c. vogeli* (14/150), 2.0% (3 /150) for *H. canis* and 3.3% (5 / 150) for *M. haemocanis*. In the group of non-thrombocytopenic animals the frequency of positives was 14% (21/150) for *E. canis*, 3.3% (5 / 150) for *A. platys*, 0.7% (1 / 150) for *B. c. Vogeli*, 4.0% (6 / 150) for *H. canis* and 1.3% (2 / 150) for *M. haemocanis. Babesia gibsoni* and *Theileria equi* were not detected using PCR assays. Statistically significant associations between thrombocytopenia and infections by hemoparasites were only observed for *E. canis* (P <0.05) and *B. c. vogeli* (P <0.05).The most frequently hemoparasitosis was Canine Monocitic Erliquiosis, which occurred in 71,33% (107/150) within thrombocytopenic dogs group and in 14% (21/150) within non-thrombocytopenic dogs group. There was a relationship between the thrombocytopenia degree observed and the infection by *E. canis*. Values of severe thrombocytopenia (<50.000 platelets/mm^3 blood) can be considered an indicator for infection of *E. canis*.

Keywords: Hematological changes*, A. platys, B. c. vogeli, E. canis, H. canis and M. haemocanis.*

1.INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses caninas são doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores hematófagos. São diagnosticadas com grande freqüência na rotina médico-veterinária, sendo responsáveis por manifestações clínicas variáveis, desde imperceptíveis até quadros clínicos mais graves culminando em óbito (LABARTHE et al., 2003).

No Brasil, os principais hemoparasitos de cães são a *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935), *Anaplasma platys* (HARVEY, SIMPSON & GASKIN, 1978), *Babesia canis* (PIANA & GALLI-VALERIO, 1895), *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905) e *Mycoplasma haemocanis* (KIKUTH, 1928).

A cidade de Goiânia apresenta condições de temperatura e umidade que favorecem a transmissão das principais hemoparasitoses caninas, pois possui um clima propício ao desenvolvimento de várias espécies de carrapatos, os quais são vetores de várias hemoparasitoses caninas. De acordo com LOULY et al. (2007), o número médio de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* encontrados na estação seca e chuvosa não diferem estatisticamente, verificando-se uma alta prevalência deste carrapato durante o ano inteiro. A alta e constante ocorrência deste vetor na cidade de Goiânia contribui para a manutenção dos hemoparasitos caninos nesta região.

A *E. canis* causa a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), uma enfermidade infecciosa que geralmente caracteriza-se por redução dos elementos sanguíneos celulares. A distribuição da erliquiose está relacionada à distribuição do carrapato vetor *R. sanguineus* (DA SILVA et al., 2010). Em Belo Horizonte, COSTA et al. (1973) relataram pela primeira vez a doença no Brasil. Posteriormente CARRILLO et al. (1976), relataram a *Ehrlichia canis* acometendo aproximadamente 20% a 42,5% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de Estados das regiões Nordeste (RAMOS et al., 2010), Sudeste (BULLA et al., 2004; MOREIRA et al., 2003), Sul (DAGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006a) e Centro-Oeste (DA SILVA et al., 2010; CESAR, 2008).

Trombocitopenia Cíclica Canina é causada pelo *Anaplasma platys* e tem sido reconhecida de forma esporádica no Brasil. Há diferentes cepas de

A. platys circulantes em cães no Brasil, como revelada pela análise de seqüências parciais do gene 16S rRNA (CARDOZO et al., 2007).

Trombocitopenia Cíclica Canina foi encontrada em todas as regiões do Brasil, embora somente alguns casos tenham sido formalmente publicados na literatura (DAGNONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2007; MOREIRA et al., 2003; FERREIRA et al., 2007). A prevalência de infecção por *A. platys* no Brasil varia de 10,3% (SALES et al., 2007) a 18,8% (FERREIRA et al., 2007).

A Babesiose canina é uma enfermidade de importância mundial, sendo causada por parasitos hematozoários pertencentes ao gênero *Babesia*. Foi reconhecida no Brasil desde o início do século 20. Esta doença é causada principalmente pela *B. c. vogeli*. Casos de infecção por *B. gibsoni* em cães no Brasil também têm sido relatada (BRACCINI et al., 1992; TRAPP et al., 2006b). Babesiose canina ocorre em praticamente todos os estados brasileiros. A prevalência da infecção varia de 35,7% a 66,9%, em inquéritos sorológicos e de 1,9% a 42%, através do exame parasitológico direto (DANTAS-TORRES, 2008).

Hepatozoonose canina foi inicialmente diagnosticada no Brasil durante a década de 1970 (MASSARD, 1979). Os cães portadores de *H. canis* podem ser assintomáticos, não desenvolvendo a forma clínica por tempo indeterminado. Quando ocorre em co-infecção com outras doenças infecciosas, como a erliquiose (MYLONAKIS et al., 2004) e babesiose, pode-se desenvolver um quadro clínico mais severo e de prognóstico variável, com uma sintomatologia exacerbada e inespecífica, e possivelmente anemia grave (O'DWYER & MASSARD, 2001), além de trombocitopenia (JUNIOR et al., 2008).

Hepatozoonose canina é prevalente no Centro-Oeste, Nordeste, Sul, Sudeste, e muito provavelmente na região Norte. A prevalência da infecção pode ser alta como 39% em algumas áreas rurais (O'DWYER et al., 2001).

Micoplasmose canina causada por *Mycoplasma haemocanis* (anteriormente *Haemobartonella canis*) tem sido esporadicamente reconhecida no Brasil, pouco se sabe sobre esta doença no nosso país devido a escassez de relatos sobre a ocorrência da doença no Brasil (RAMOS et al., 2010).

A infecção por *M. haemocanis* já foi descrita no Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil. Manifestações clínicas da doença em imunocompetentes é rara. Por outro lado, cães imunossuprimidos (por exemplo, os cães

esplenectomizados) são particularmente suscetíveis à infecção (DANTAS-TORRES, 2008). Alguns casos clinicamente evidentes têm sido descrito em cães com infecções concomitantes com outros hemoparasitos (GREENE, 2006).

A trombocitopenia é muito comum em cães infectados com *E. canis* (82%), ocorrendo em todas as fases da doença. Na infecção por *A. platys,* parasitemias e posterior episódios de trombocitopenia se repetem em intervalos de 1 a 2 semanas. Dentro de poucos dias após o aparecimento de plaquetas parasitadas, a contagem de plaquetas diminui drasticamente, e os organismos geralmente não são mais vistos (GREENE, 2006).

A trombocitopenia em cães com babesiose é mais frequente que em cães com erliquiose. A trombocitopenia em infecções por *Hepatozoon canis* está presente em aproximadamente um terço dos cães com hepatozoonose. A maioria dos cães não esplenectomizados com infecção por *M. haemocanis* não desenvolvem sinais clínicos da doença (GREENE, 2006).

Em virtude da alta prevalência de trombocitopenia encontrada em cães infectados com hemoparasitos, o uso da contagem de plaquetas como teste de triagem para as hemoparasitoses tem sido propostos (BULLA et al., 2004; GREENE, 2006). A contagem de plaquetas pode ser um método barato e confiável para exame de triagem de cães suspeitos de hemoparasitoses em uma área endêmica (GREENE, 2006).

Estudos mais esclarecedores, principalmente os moleculares, são necessários para a determinação das espécies existentes nas diferentes regiões do país e de sua relação com a trombocitopenia observada nos exames laboratoriais, permitindo melhor compreensão sobre as enfermidades.

Objetivou-se com este trabalho identificar os principais hemoparasitos encontrados nos cães atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, e relacionar a ocorrência de hemoparasitos com os casos clínicos de trombocitopenia.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erliquiose canina

A Erliquiose canina é uma doença causada por bactérias estritamente intracelulares, gram-negativas, pertencentes a Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae e gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001). É considerada uma das mais importantes doenças que acometem os cães, podendo ser fatal, tanto para os cães domésticos, quanto para os demais membros da família *Canidae* (BORIN et al., 2009).

As espécies do gênero *Ehrlichia* são pequenos organismos cocóides ou elipsoidais, frequentemente pleomórficos, gram-negativos, parasitas intracelulares obrigatórios de leucócitos, especialmente macrófagos e linfócitos (DUMLER et al., 2001).

No Brasil, a única espécie do gênero *Ehrlichia* acometendo canídeos descrita até o momento é a *E. canis,* responsável pela erliquiose monocítica canina (EMC) (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Existem três cepas de *E. canis*, isoladas e caracterizadas geneticamente como: “Flórida” (M73226), “Oklahoma” (M73221) e “Israeli” (U26740). Apesar das cepas terem origens geográficas distintas, existe uma grande similaridade genética entre elas, de acordo com a sequência do RNA ribossomal 16S (DAGNONE et al., 2001).

A EMC foi descrita inicialmente por DONATIEN & LESTOQUARD em um cão Pastor Alemão no Instituto Pasteur na Algéria em 1935. Foi observada no esfregaço sanguíneo de cães infestados por *R. sanguineus* a presença de pequenos organismos semelhantes a rickettsia no interior de monócitos, que foram nomeadas *Rickettsia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935).

Posteriormente, no ano de 1945, MOSHKOVSHI renomeou a *Rickettsia canis* para *Ehrlichia canis*, em homenagem ao famoso bacteriologista alemão, Paul Ehrlich (McDADE, 1990). No Brasil, a primeira descrição da doença causada por *E. canis* foi feita em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais por COSTA et al. (1973). Posteriormente CARRILLO et al. (1976), relataram a *Ehrlichia canis* acometendo aproximadamente 20% a 42,5% dos cães atendidos em hospitais e

clínicas veterinárias de Estados das regiões Nordeste (RAMOS et al., 2010), Sudeste (BULLA et al., 2004; MOREIRA et al., 2003), Sul (DAGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006a) e Centro-Oeste (DA SILVA et al., 2010; CESAR, 2008).

A prevalência da infecção pode ser tão elevada quanto 46,7% em pacientes assintomáticos e 78% em cães sintomáticos. O risco de infecção por *E. canis* é maior para os cães que vivem em casas em relação aos cães que vivem em apartamentos. Isto é esperado porque os cães que vivem em casas com quintais são teoricamente mais expostos aos carrapatos do que aqueles que vivem em apartamentos (DANTAS-TORRES, 2008).

A transmissão de *E. canis* ocorre durante o parasitismo por ninfas e/ ou adultos do carrapato *R. sanguineus*, o qual mantém a bactéria por transmissão transestadial. Como não ocorre transmissão transovariana de *E. canis* em carrapatos, as larvas de *R. sanguineus* não são importantes na transmissão, porém podem se infectar pelo agente, mantendo a infecção até o estágio adulto (UENO et al., 2009).

No carrapato, as erliquias se disseminam a partir do intestino para os hemócitos e para a glândula salivar. Durante a alimentação, os carrapatos inoculam a secreção salivar contaminada com erlíquias no interior do sítio de alimentação no hospedeiro. Os carrapatos sobrevivem como adultos sem se alimentar, por 155 a 568 dias, e podem transmitir a infecção por até 155 dias após se tornarem infectados (DAGNONE et al., 2001). A transmissão pode ocorrer também por meio de transfusões sanguineas de um cão infectado para outro suscetível (BORIN et al., 2009).

A *E. canis* localiza-se nas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) do fígado, sangue, baço e linfonodos, onde se replicam por divisão binária. Geralmente, a mórula é observada nos leucócitos na fase aguda da infecção, mas em pequeno número e por um período curto de tempo. A mórula é formada por um conjunto de microrganismos firmemente envoltos por uma membrana (MENDONÇA et al., 2005).

Os hospedeiros vertebrados mais comuns são os da família *Canidae* (cães, coiotes, raposa e chacal). Porém, já foram relatados ocorrência na Venezuela de pelo menos seis casos clínicos descritos de erliquiose humana

causada por *E. canis*, indicando que este agente pode causar infecções no homem (PEREZ et al., 2006).

No Brasil os primeiros casos de ehrlichiose humana foram registrados por CALIC et al., (2004) e COSTA et al., (2007) com diagnóstico sorológico positivo para *E. chaffensis* em indivíduos com sintomas sugestivos de erhlichiose no estado de Minas Gerais.

O período de incubação da EMC é de 8 a 20 dias. A fase aguda dura de duas a quatro semanas. Durante esse período, o microrganismo replica-se nas células da circulação, e o parasita dissemina-se para órgãos como baço, fígado e linfonodos, infectando as células mononucleares. Nesta fase ocorre trombocitopenia entre 10 e 20 dias pós infecção e um aumento no número de plaquetas imaturas circulantes, que persiste por toda a doença na maioria dos animais (GREENE, 2006).

A EMC é caracterizada por manifestações clínicas multissistêmicas, que variam na intensidade de acordo com as fases da doença (UENO et al., 2009). As fases da EMC do ponto de vista clínico são: aguda, subclínica e crônica. Acomete cães de idades variadas e já foi relatada em cães com dois meses a 13 anos de idade (BORIN et al., 2009).

A manifestação da doença pode ser afetada pela patogenicidade das diferentes cepas de *E. canis* e por co-infecções com outros patógenos, como *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis* transmitida pelo mesmo vetor (HARRUS & WANER, 2010).

As principais alterações clínicas observadas são apatia, anorexia/ hiporexia, vômito, secreção oculonasal, esplenomegalia, mucosas pálidas, hemorragias (petequias e epistaxe) e uveíte (NAKAGHI et al., 2008; BORIN et al., 2009).

Os sinais clínicos observados na fase aguda ainda são inespecíficos incluindo febre, secreção ocular e nasal, anorexia, depressão, perda de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia, tendência a hemorragias (petequias, equimoses e epistaxe), vasculite, sinais neurológicos, musculares, oculares e de poliartrite (DAGNONE et al., 2001; HARRUS & WANER, 2010). Estes sinais clínicos geralmente diminuem espontaneamente dentro de uma a quatro

semanas, porém os cães podem permanecer infectados subclinicamente (ORIÁ et al. ,2004).

Os sinais oculares podem estar presentes em todas as fases da doença e envolvem a maioria das estruturas oculares. A prevalência de lesões oculares em casos de infecção natural varia de 10% a 15% e a severidade do comprometimento ocular muda de paciente para paciente (ORIÁ et al. ,2004).

As lesões oftalmológicas incluem uveíte anterior, coriorretinite, hemorragia da retina. A cegueira pode ocorrer como resultado da hiperviscosidade sanguínea levando à hemorragia sub-retiniana e descolamento de retina (HARRUS & WANER, 2010).

Os achados laboratoriais mais comuns são de trombocitopenia e anemia (ALMOSNY, 1998). A trombocitopenia na fase aguda pode ocorrer por aumento no consumo de plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, aumento no sequestro esplênico e destruição imunomediada ou por diminuição da meia vida das plaquetas (ALMOSNY & MASSARD, 2002). A própria infecção por *E. canis* causa lise de plaquetas, porém, casos sem trombocitopenia podem ocorrer (ACCETTA, 2008). Ocorre também alteração na função das plaquetas, com muitos animais apresentando sangramento superficial, mesmo com o número de plaquetas e perfil de coagulação normais (DAGNONE et al., 2001).

Na fase aguda raramente observa-se leucocitose. De acordo com NELSON & COUTO (2001), a anemia nesta fase é do tipo normocítica normocrômica regenerativa, devido à perda de sangue.

Durante a fase aguda, os cães infectados podem se recuperar espontaneamente ou entrar numa fase assintomática ou subclínica, podendo permanecer infectados por longos períodos. Nesta fase, cães imunocompetentes podem eliminar o parasito ou, ocasionalmente, desenvolver a fase crônica da doença, caracterizada por supressão medular, sangramentos por mucosas e conjuntivas e alta letalidade (UENO et al., 2009).

A fase crônica desenvolve-se em alguns animais após a fase subclínica e pode variar de leve a severa. Na severa, ocorre comprometimento da medula óssea com pancitopenia (DAGNONE et al., 2001). Nesta fase, sinais clínicos semelhantes aos observados na fase aguda podem ocorrer, porém com maior

intensidade e gravidade. Frequentemente observa-se palidez das mucosas, fraqueza, sangramento e perda de peso significativa (HARRUS & WANER, 2010).

Dentre as alterações hematológicas relatadas com maior frequência na literatura, destacam-se a anemia arregenerativa e, em menor frequência, a anemia regenerativa (fase aguda). Das alterações presentes no leucograma, destacam-se o desvio nuclear de neutrofilos para a esquerda e a eosinopenia. Outros achados como leucopenia e monocitopenia são considerados menos frequentes (BORIN et al., 2009)

O diagnóstico da EMC pode ser feito baseando-se nos resultados do exame parasitológico direto, hematologia, provas bioquímicas, cultivo, sorologia (ensaio de imunofluorescência indireta e ELISA), associada com sinais clínicos e técnicas de biologia molecular (DAGNONE et al., 2003).

A suspeita clínica pode ser confirmada por meio de achado de mórulas e inclusões de *Ehrlichia canis* em leucócitos de esfregaços sanguíneos. No entanto, é importante ressaltar que a ausência de parasitos em esfregaços de sangue periférico não exclui a possibilidade de infecção (BORIN et al., 2009; NAKAGHI et al., 2008).

A detecção de mórulas de *E. canis* ocorre por um curto período de tempo nos monócitos, e a visualização durante as fases subclínicas e crônicas é extremamente rara. Todavia, a busca por mórulas em monócitos circulantes é o método de diagnóstico mais rotineiro para a EMC, mas em muitos casos ineficaz, pois a detecção direta de *E. canis* é dificil e incomum (NAKAGHI et al., 2008).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular conduziram a melhoria da detecção de DNA de *E. canis* para o diagnóstico da erliquiose. A amplificação de DNA de *E. canis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) têm promovido maior sensibilidade, especificidade e diagnóstico direto de confiança (NAKAGHI et al., 2008).

2.2 Trombocitopenia cíclica infecciosa canina

A trombocitopenia cíclica infecciosa canina é uma doença causada pelo *Anaplasma platys,* bactéria gram negativa que infecta as plaquetas do cão,

pertencente à ordem Rickettssiales, família *Anaplasmataceae* e gênero *Anaplasma* (FERREIRA et al., 2008).

O *A. platys* foi descrito pela primeira vez por HARVEY et al. (1978) na Flórida, sendo denominado inicialmente como *Ehrlichia platys*. Em 2001, esse organismo foi reclassificado como pertencendo à família *Anaplasmataceae* e ao gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). Casos clínicos da trombocitopenia cíclica infecciosa canina tem sido reportada por todo o mundo, incluindo os Estados Unidos, Grécia, Taiwan, Espanha, Sul da China, Austrália, Tailândia e Venezuela (HUANG et al., 2005).

Nos Estados Unidos, o *A. platys* é considerado minimamente patogênico, e geralmente identificado como obervação acidental durante o exame de esfregaço sanguíneo (GREENE, 2006). Entretanto, existem casos de linhagens mais virulentas de *A. platys* em diversos países do mediterrâneo. As linhagens de *A. platys* descritos na Grécia, França e Espanha são consideradas mais virulentas que as linhagens da América do norte e outros países (CARDOSO et al., 2008). O *A. platys* também causa trombocitopenia em cães nas várias regiões do Brasil, não sendo rara a coinfecção com *E. canis e B. c. vogeli*, podendo o carrapato *R. sanguineus* ser o mesmo vetor dessas três espécies (FERREIRA et al., 2008).

CARDOZO et al. (2007) compararam a sequência gênica do *A. platys* e determinaram a ocorrência deste agente em cães da cidade de Ribeirão Preto, Brasil, indicando que existam pelo menos três linhagens de *A. platys* circulando na América do Sul.

Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina foi encontrada em todas as regiões do Brasil, embora somente alguns casos tenham sido formalmente publicada na literatura (DAGNONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2007; MOREIRA et al., 2003; FERREIRA et al., 2007). A prevalência de infecção por *A. platys* varia de 10,3% (SALES et al., 2007) a 18,8% (FERREIRA et al., 2007). Pouco se sabe sobre fatores de risco associados a doença no Brasil. A infecção por *A. platys* raramente é associada à doença clínica, exceto em casos de coinfecção com outros organismos (por exemplo, *E. canis* e *B. c. vogeli*), que é comum no Brasil (DANTAS-TORRES, 2008).

Acredita-se que o vetor do agente seja o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, porém estudos experimentais não conseguiram reproduzir a transmissão por este vetor, por isso o modo de transmissão permanece incerto (CARDOZO et al., 2007).

O *A. platys* causa parasitemia e trombocitopenia cíclica a intervalos de 10 a 14 dias. Alguns dias após a infecção ocorre uma diminuição brusca no número de plaquetas e o *A. platys* desaparece da circulação. Em seu ponto mais baixo, a trombocitopenia pode ser grave (20.000 a 50.000 plaquetas/µL), e a agregação plaquetária fica diminuída (GREENE, 2006). A contagem de plaquetas retorna a valores próximos aos de referência em aproximadamente quatro dias. A parasitemia e trombocitopenia subsequentes tendem a ocorrer periodicamente em intervalos de uma a duas semanas. Com a diminuição do número de plaquetas infectadas, a trombocitopenia pode continuar severa ou diminuir de intensidade (DAGNONE et al., 2001).

Os sinais clínicos começam após um período de incubação de 8 a 15 dias, com alguns sinais sugestivos, como anorexia e distúrbios hemostáticos (DAGNONE et al., 2001). Cães infectados frequentemente são assintomáticos (CARDOZO et al., 2007). Hiperplasia folicular de nódulos linfáticos e plasmacitose tem sido observados na fase aguda da infecção, e alguns órgãos, tal como baço, podem desenvolver hemorragia (HUANG et al., 2005).

Experimentalmente, por volta do quarto dia, depois do surgimento inicial das plaquetas infectadas, 30 a 60% das plaquetas podem conter inclusões, mas a plaquetometria permanece normal. Dentro dos três a quatro dias subsequentes, ocorre queda considerável na contagem plaquetária. Geralmente os microrganismos não são visualizados durante o ponto mais baixo da plaquetometria, e a quantidade de plaquetas retorna ao normal dentro de três a quatro dias. Em mais uma a duas semanas, o *A. platys* reaparece nas plaquetas, e a plaquetometria começa a declinar. A cada ciclo sucessivo, a percentagem de plaquetas infectadas decresce, até que apenas algumas plaquetas serão infectadas, a trombocitopenia torna-se menos pronunciada, e finalmente cessam as alterações hematológicas (GREENE, 2006).

A trombocitopenia é um achado comum em infecções por *A. platys*, entretanto, esse achado não é patognomônico desta Rickettsiose ou de outra

doença (FERREIRA et al., 2008). Uma anemia arregenerativa normocítica normocrômica, associada à anemia de inflamação, leucopenia, hipoalbuminemia, e hiperglobulinemia foi descrita em associação com a infecção experimental por *A. platys* (GREENE, 2006).

Quando se suspeita de uma infecção por *A. platys,* o entendimento correto das manifestações clínicas, bem como dos exames laboratoriais e escolha do método diagnóstico, torna-se de extrema importância para uma conduta clínica ideal (MACIEIRA, 2003).

Dentre os métodos de diagnóstico, os mais utilizados são a pesquisa de inclusões plaquetárias em esfregaço sanguíneo, detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta, ou amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (FERREIRA et al., 2008).

O *A. platys* é observado em plaquetas, podendo ocorrer como uma, duas ou três inclusões. Caracterizada por causar parasitemia e trombocitopenia cíclica, as inclusões normalmente não são observadas na fase de trombocitopenia (ALMOSNY & MASSARD, 2002).

O diagnóstico da infecção por *A. platys* tem sido feito mais usualmente utilizando o parasitológico direto, visualizando os organismos nas plaquetas que foram coradas com o corante tipo Romanowsky, Diff-Quik e giemsa. Entretanto, devido a parasitemia cíclica da doença, examinar esfregaços sanguíneos corados para verificar inclusões intra-plaquetárias de *A. platys* normalmente é demorada e pouco gratificante já que as inclusões são muitas vezes presentes em baixos números ou ausentes (MARTIN et al., 2005). Outro fator que dificulta o diagnóstico por meio de observação é que têm
sido descritos casos de inclusões em plaquetas em infecção por *E. canis* (ALMOSNY, 1998).

ARRAGA-ALVORADA et al. (2003) relataram que na Venezuela, onde até 97% de plaquetas são parasitadas, o diagnóstico da infecção por *A. platys* é feito rotineiramente examinando esfregaço de sangue corados. Ao utilizar a microscopia eletrônica, encontrou-se diferentes estruturas entre a infecção experimental e a infecção de cães naturalmente parasitados, sugerindo a existência de diferentes cepas.

A parasitemia frequentemente é baixa, a infecção é de difícil detecção em exames sanguíneos e exames sorológicos podem dar falso positivos devido a reações cruzadas com outras espécies. Métodos baseados no PCR podem ser desenvolvidos para a detecção específica de *A. platys* em amostras de sangue de cães com alta acuracia (CARDOZO et al.,2007).

2.3 Babesiose canina

A babesiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia* spp., membro do filo Apicomplexa e transmitido pela picada de um carrapato infectado (ADASZEK & WINIARCZYK, 2008).

As espécies do gênero *Babesia* são muitas vezes referida como piroplasmas, um termo utilizado para protozoários fenotipicamente semelhantes que infectam hemácias de mamíferos (SMITH & KILBORNE, 1983).

Babesia canis e *Babesia gibsoni* são as duas espécies predominantes, naturalmente, capazes de infectar cães. Cepas desses organismos são encontrados em todo o mundo (GREENE, 2006). Uma outra espécie descrita acometendo cães é a *Theileria equi* (anteriormente denominada *Babesia equi)* (CRIADO-FORNELIO et al., 2004).

Babesia spp. são morfologicamente classificados como piroplasmas grandes (Medindo 3,0 - 5,0 µm), ou pequenos (1,5 - 2,5 µm). *B. canis* é um piroplasma grande (2,4 µm X 5 µm), piriformes que normalmente são encontrados aos pares dentro das hemácias, apresentando até oito ou mais merozoítos e *B. gibsoni* é um piroplasma pequeno (1 µm X 3.2 µm), comumente observados individualmente em formas circulares ou piriformes. Os parasitos podem ser diferenciados através da observação de merozoítos intraeritrocitários durante a avaliação do esfregaço de sangue (GREENE, 2006).

Entretanto, como a situação que envolve a taxonomia das espécies de *Babesia* de origem canina não se encontra totalmente definida, o diagnóstico definitivo com base nesses critérios pode ser questionado (PASSOS et al., 2005). Trabalhos recentes têm demonstrado a infecção de cães por outras espécies pequenas como *Theileria equi* (FORNELIO et al., 2004; FRITZ, 2010), *B. microti-*

like (ZAHLER et al., 2000; CAMACHO et al., 2001), *B. conradae* (KJEMTRUP & CONRAD, 2006), e também, possivelmente, uma nova espécie do grupo das grandes babésias (BIRKENHEUER et al., 2004).

O parâmetro morfológico isolado não é suficiente para distinção de todos os piroplasmídeos, por exemplo, entre *Babesia microti*, *B. gibsoni* e *T. equi.* ZAHLER et al. (2000), por meio de análises do gene 18S rRNA, fizeram caracterização genotípica de um pequeno piroplasma, isolado de cão com babesiose clínica adquirida na Espanha, mais próxima filogeneticamente às espécies *Babesia microti*, *Babesia rodhaini* e *Theileria equi*, quando comparada à *Babesia gibsoni*. A este novo patógeno os autores atribuíram o nome de *Theileria annae*. Posteriormente, CAMACHO et al. (2001) verificaram que a ocorrência desta nova espécie era frequente no noroeste da Espanha. Por isso é de grande importância a realização de testes moleculares que confirmem a identidade do microrganismo envolvido nas infecções dos animais. Para esta finalidade é necessário o emprego de testes moleculares nos estudos relativos a etiologia da babesiose canina (ZAHLER et al., 2000).

Há três subespécies diferentes de *B. canis*: *B. canis canis, B. canis rossi*, e *B. canis vogeli*. Estas subespécies são morfologicamente idênticas, mas têm diferentes vetores e patogenicidade (ADASZEK & WINIARCZYK, 2008). *B. canis canis* é transmitida pelo *Dermacentor reticulatus* na Europa e norte da Asia, *B. canis vogeli* é transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* em regiões tropicais e subtropicais (África do sul, África Oriental, Estados Unidos, Brasil, América do Sul, Japão e Austrália) e *B. canis rossi* transmitida por *Haemaphysalis leachi* na África do Sul e leste do Sudão (EIRAS et al., 2008).

B. gibsoni ocorre na Ásia, América do Norte, no norte e leste da África, Austrália e Europa (FOLDVARI et al., 2005). No Brasil alguns relatos sugerem a ocorrência de uma pequena *Babesia* no Estado do Rio Grande do Sul (BRACCINI et al., 1992), e apenas uma confirmação molecular de *B. gibsoni* foi realizada em cães do Sul do Brasil (TRAPP et al., 2006b).

O primeiro registro de babesídeo em cães aconteceu no ano de 1895, quando PIANA & GALLI-VALÉRIO observaram a existência de parasitos grandes nas hemácias de cães na Itália descrevendo-os como *Piroplasma canis*. Posteriormente, PATTON (1910) descreveu a presença de formas parasitárias

anelares e ovóides em hemácias de cães na Índia, classificando-as como *Piroplasma gibsoni.*

A primeira identificação de *B. gibsoni* foi feita por PATTON (1910), na Índia, parasitando cães e chacais. O primeiro relato de infecção por *B. gibsoni* nos EUA foi em 1968 em um Bull Terrier que se infectou na Malásia (GROVES, 1968). Casos de babesiose canina tem sido relatados em muitos Estados brasileiros, como Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná (DANTAS-TORRES & FIGUEREDO, 2006). A prevalência da infecção varia de 35,7% a 66,9%, em inquéritos sorológicos e de 1,9% a 42%, através do exame parasitológico direto (DANTAS-TORRES, 2008).

Apesar de babesiose canina ser amplamente difundida no Brasil, a prevalência de infecção por *Babesia* em cães é desconhecida na maioria das áreas onde a doença é endêmica. Inquéritos sorológicos revelaram que a prevalência de anticorpos contra o parasita *Babesia* em cães varia de 35,7% a 66,9%. Inquéritos parasitológicos mostraram que o prevalência de infecção por *Babesia* varia de 1,9% a 42% (DANTAS-TORRES & FIGUEREDO, 2006).

A transmissão ocorre durante o repasto sangüíneo dos carrapatos ixodídeos, através da inoculação de esporozoítos infectantes presentes na glândula salivar dos carrapatos. A principal espécie envolvida na transmissão de *B. canis* é o *R. sanguineus*, conhecido vulgarmente como carrapato marrom do cão (O'DWYER & MASSARD, 2002).

Existem dois tipos de transmissão: a transmissão transestadial ou horizontal, onde os carrapatos adquirem a *Babesia* como larva ou ninfa e a transmitem no estádio seguinte; e a transmissão transovariana ou vertical, onde a fêmea infectada transmite o parasito para seus descendentes, com as larvas já eclodindo infectadas. Todos os estádios podem transmitir *B. canis*, sendo as ninfas e adultos mais eficientes na transmissão (O'DWYER & MASSARD, 2002).

A patogenia clínica das babesioses causadas por *B. canis* e *B. gibsoni* envolve anemia hemolítica progressiva. Em contraste, a doença mais severa causada por *B. canis rossi* pode envolver hipóxia, choque hipotensivo com coagulação intravacular disseminada (CID), inflamação sistêmica e disfunção múltipla de órgãos (WELZL et al., 2001).

A gravidade da doença varia com a espécie do vetor e a idade, raça e estado imune do cão. Filhotes e cães jovens são altamente susceptíveis, sendo letal na ausência de tratamento (IRWIN, 1991).

A doença apresenta-se de forma hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica. De maneira geral as características clínicas incluem febre, perda de peso, anorexia, hematúria e icterícia. Animais com a doença subclínica raramente apresentam sinais clínicos, entretanto, os sinais aparecem após estresse, administração de corticóides e doenças concomitantes. Além disso, é importante identificá-la, pois os animais têm potencial de transmissão via transfusão sanguínea ou transplacentária, neste caso os filhotes têm alta mortalidade. (ALMOSNY, 2002).

Em animais com infecção experimental, observou-se que apesar dos valores de hematócrito estarem diminuídos, a maioria dos animais não apresentaram sinais clínicos de babesiose (BICALHO et al., 2002).

Anemia e trombocitopenia são achados comuns nos exames laboratoriais que podem ser muito variados em outros parâmetros como leucograma, bioquímica sérica e urinálise, dependendo da fase da doença ou manifestação clínica (ALMOSNY, 2002).

Tradicionalmente, a identificação das espécies foi baseada na morfologia dos piroplasmas intraeritrocitários e na especificidade de hospedeiros. O diagnóstico definitivo baseia-se na identificação de parasitas grandes (2,5 a 3 X 5µm) piriformes em hemácias do hospedeiro em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Podendo ser utilizado também a técnica de sorologia e PCR, especialmente em animais subclínicos, que raramente apresentam o protozoário evidenciado em hemácias (JAIN, 1993).

2.4 Hepatozoonose canina

Hepatozoonose canina é uma doença causada por protozoários do gênero *Hepatozoon* (RUBINI et al., 2009). O gênero *Hepatozoon* compreende mais de 300 espécies, 46 delas são conhecidas como infectantes de mamíferos, 120 infectam reptéis e as outras são encontradas como parasitos de aves e anfíbios (FORLANO et al., 2007).

Duas espécies das 46 associadas com hepatozoonoses em mamíferos são conhecidas como causadoras de doença nos cães, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*. *Hepatozoon canis* foi originalmente descrito na Índia como agente etiológico da *hepatozoonose* canina e acomete cães em diversas regiões no mundo incluindo o Brasil, enquanto *H. americanum* é a espécie que infecta cães no sul dos Estados Unidos (RUBINI et al., 2009).

A hepatozoonose canina foi descrita pela primeira vez em 1906 na Índia, causada pelo microorganismo na ocasião chamado *Leukocytozoon canis* (JAMES, 1905), hoje conhecido como *Hepatozoon.*

A espécie *H. canis* é a mais comumente estudada associada a hepatozoonoses de cães da Europa, Ásia, África e América latina. Geralmente, hepatozoonoses causadas por *H. canis* é caracterizada por desordens leve e crônica afetando o baço, linfonodos e médula óssea, resultando em anemia e letargia. Na América do Norte *Hepatozoon americanum* tem sido identificado como o agente causador de uma doença emergente severa afetando cães e podendo evoluir a óbito (FORLANO et al., 2007).

Hepatozoonose canina foi inicialmente diagnosticada no Brasil durante a década de 1970 (MASSARD, 1979). Esta doença é causada pelo *Hepatozoon canis*, que recentemente foi caracterizado molecularmente no Brasil. Hepatozoonose canina é prevalente no Centro-Oeste, Nordeste, Sul, Sudeste, e muito provavelmente na região Norte. A prevalência da infecção pode ser alta como 39% em algumas áreas rurais. Pouco se sabe sobre os fatores de risco associados à infecção por *H. canis* no Brasil (O'DWYER et al., 2001).

CHRISTOPHERS (1907) identificou o carrapato marron do cão, *R. sanguineus*, como o hospedeiro invertebrado de *H. canis*, entretanto outras espécies tem sido identificadas como possíveis vetores deste protozoário, tal como *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis flava* no Japão (MURATA et al., 1993) e *Amblyomma ovale* no Brazil (FORLANO et al., 2007).

A principal espécie de carrapatos que parasita cães no Brasil é o *Rhipicephalus sanguineus*, entretanto, ocorre predominantemente em áreas urbanas e menos abundantemente em áreas rurais (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Estudos epidemiológicos demonstram uma maior freqüência de *H. canis* de parasitismo de áreas rurais (O´DWYER et al., 2001).

A maior freqüência de *H. canis* em áreas rurais e a possibilidade de que carrapatos *Amblyomma* ssp. possam ser os principais vetores deste protozoário demonstram a necessidade de maiores estudos sobre a epidemiologia, transmissão e patogenia da hepatozoonose canina no Brasil (GARCIA DE SÁ et al., 2007).

Durante um estudo sobre hepatozoonose canina em duas áreas rurais do Rio de Janeiro, FORLANO et al. (2005) encontraram cães naturalmente infectados por *Hepatozoon canis* infestados por *Amblyomma cajennense, Amblyomma ovale, Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus*.

FORLANO et al. (2005) e RUBINI et al. (2009) comprovaram a participação da espécie *A. ovale* na transmissão da hepatozoonose canina no Brasil, através da demonstração de oocistos de *H. canis* na hemolinfa do vetor *A. ovale* coletados de cães naturalmente infectados.

A transmissão para os cães (hospedeiro intermediário) ocorre através da ingestão de carrapatos infectados por oocistos maduros (com esporozoítos infectantes) de *H. canis* na sua hemocele, com a digestão ocorre a liberação de esporozoitos, os quais penetram na parede intestinal e são transportados via sanguínea até o baço, linfonodos, fígado, médula óssea, pulmões e músculos. Nestes locais multiplicam-se, formando dois tipos distintos de esquizontes, cada qual contendo micromerozoitos e macromerozoitos (MASSARD, 1979).

Além da transmissão horizontal para o hospedeiro intermediário, ficou confirmado por FORLANO (2007), que é possível a transmissão congênita de *H. canis*, da mãe para a ninhada.

A infecção do carrapato inicia-se no estágio de ninfa e completa-se na fase adulta. Os carrapatos são infectados ao ingerirem sangue de cães que contenham gametócitos no interior de neutrófilos ou monócitos. No tubo digestivo do vetor ocorre a fusão dos gametas, com posterior formação de oocinetos localizados na hemocele do carrapato (O'DWYER & MASSARD, 2001).

Existem evidências de diferenças na patogenicidade determinada por este agente nos animais das diferentes regiões do País e do mundo. Embora haja divergências relativas a esta enfermidade, a maioria dos estudos comprovam que a associação entre diferentes parasitos leva a um quadro clínico mais severo quando comparado ao parasitismo isolado (MUNDIM et al., 2008).

Infecção por *H. canis* varia de casos assintomáticos a casos severos e potencialmente fatais de desordens que causam febre, paralisia, anorexia, emaciação, anemia, discargas oculares, perda de peso e sinais característicos de enfermidades de caráter crônico debilitante. A forma branda desta doença esta associada com a baixa parasitemia, enquanto sinais severos são encontrados com alta parasitemia (BANETH et al., 2003).

As anormalidades comumente encontradas em análises laboratoriais são anemia, leucocitose, neutrofilia e aumento da fosfatase alcalina. Na hepatozoonose causada por *H. canis*, achados clínicos e laboratoriais são frequentemente associados pela presença de infecções concomitante com outros hemoparasitos, as alterações encontradas não são atribuídas exclusivamente a infecção por *H. canis* (MUNDIM et al., 2008).

Em contraste com a doença branda normalmente encontrada na infecção por *H. canis*, a infecção por *H. americanum* causa uma doença debilitante e freqüentemente fatal (EWING et al., 2002).

Diversos métodos podem ser utilizados no diagnóstico de *Hepatozoon* spp. em cães, e de acordo com a técnica utilizada os resultados podem ser variados. O método de diagnóstico de *Hepatozoon* spp. realizado rotineiramente se fundamenta na identificação morfológica de gamontes intra-leucocitários (em neutrófilos ou monócitos) em esfregaço de sangue periférico corado pelo Giemsa e observados pela microscopia direta (BANETH et al., 1997). Entretanto, a análise morfológica dos mesmos não possibilita a diferenciação das diferentes espécies de *Hepatozoon* existentes, pois a morfologia dos gamontes encontrados pode variar em função da espécie hospedeira e também da espécie de *Hepatozoon* encontrada (WANER et al., 1994).

O desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico como a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem auxiliando no avanço das pesquisas em relação a detecção das espécies de *Hepatozoon* de cães, assim como também tem auxiliado na classificação taxonômica destes e de outros agentes infecciosos. A PCR também auxilia na detecção de novas cepas ou variantes de espécies e permite a detecção precoce de infecção (RUBINI et al., 2008).

2.5 Micoplasmose canina

A micoplasmose canina é uma enfermidade de distribuição mundial causada por bactérias pequenas, não cultivaveis in vitro, sem parede celular e que infecta a parede de eritrócitos (NOVACCO et al., 2010).

As espécies de micoplasmas mais comumente descritas em cães são*: Mycoplasma haemocanis, Candidatus Mycoplasma haematoparvum, Mycoplasmas canis* e *M. cynos*, estando associada a presença de anemia, infecções do trato urogenital e doenças respiratórias. No entanto, o isolamento de desconhecidos *Mycoplasma* sp. de cães indica que novas espécies ainda não foram descritas e ainda há muito a aprender sobre esses microorganismos (CHALKER, 2005).

Mycoplasma haemocanis, anteriormente denominado *Haemobartonela canis* é a espécie mais comum, conforme classificação baseada na análise da seqüência do gene 16S rRNA o agente passou a ser denominado *Mycoplasma haemocanis,* deixando de pertencer a família *Anaplasmataceae* e integrando o gênero *Mycoplasma* (MESSICK et al., 2002).

O *M. haemocanis* foi identificado pela primeira vez em 1928 (KIKUTH,1928), desde então vários casos foram descritos (CARR & ESSEX, 1944; PRYOR & BRADBURY, 1975; BRISON & MESSICK, 2001).

Existem poucas informações a respeito da prevalência da infecção nos cães, já que muitos indivíduos infectados não apresentam sinais clínicos da enfermidade. NOVACCO et al. (2010) obteve uma prevalência de 5,1% (43/850) de *M. haemocanis* para cães oriundos de Portugal, Italia e Espanha. Os cães mais jovens, sem raça definida e provenientes de canis foram mais acometidos pelo hemoparasito. Os fatores de risco encontrados estão relacionados com as condições de vida do animal e a presença de ectoparasitos.

Micoplasmose canina tem sido esporadicamente reconhecida no Brasil, pouco se sabe sobre esta doença no nosso país, porque os relatos sobre a ocorrência da doença no Brasil são muito escassos. A infecção por *M. haemocanis* foi descrita no sul e sudeste do Brasil. Manifestação clínica da doença em imunocompetentes é incomum. Por outro lado, cães

imunossuprimidos (por exemplo, os cães esplenectomizados) são particularmente suscetíveis à infecção (DANTAS-TORRES, 2008).

Mycoplasma haemocanis foi descrito em esfregaços de sangue de cães em Belo Horizonte, região Sudeste do Brasil (O'DWYER et al., 1997), e posteriormente caracterizados por PCR em quatro cães não esplenectomizados de um Hospital Veterinário de Londrina, Sul do Brasil (DE MORAIS et al., 2003), bem como em outras populações canina (SANTOS, 2008). Recentemente, uma pesquisa de PCR foi realizada em Belo Horizonte e arredores para comparar taxas de infecção para *M. haemocanis* entre zonas urbanas e rurais. Vinte (11,3%) dos 176 cães que vivem nas áreas rurais foram positivas, sendo que seis dos 104 (5,8%) cães de áreas urbanas abrigavam o organismo.

Uma pesquisa utilizando PCR para a detecção de *M. haemocanis* e *Candidatus M. haematoparvum* foi realizado em Londrina (SANTOS, 2008). Um total de 147 cães com pelo menos uma anormalidade laboratorial (Leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, ou anemia) foram testados, resultando em duas (1,4%) amostras positivas para *M. haemocanis* e 11 (7,5%) para *Candidatus M. haematoparvum*.

Além disso, dois outros novos hemoplasmas foram identificados por PCR em cães do Brasil (SANTOS, 2008). Um hemoplasma canino mais parecido com a *'Candidatus M. haemominutum'* (98% de identidade de 16S seqüência do gene rRNA) do que com o *'Candidatus M. haematoparvum'* foi detectado por PCR em um cão de Londrina e um outro hemoplasma com a identidade de 98-100% com a *'Candidatus M. turicensis'* em cães esplenectomizados de Porto Alegre (SANTOS, 2008).

Novamente, não está claro se esta é uma nova espécie canina de hemoplasma ou uma demonstração de que *'Candidatus M. turicensis'* também pode infectar cães (BIONDO et al., 2009).

Os meios naturais de transmissão ainda não foram definitivamente estabelecidos. Acredita-se que o *R. sanguineus*, seja o potencial vetor (NOVACCO et al., 2010). Há também evidências de um possível transmissão transplacentária (KEMMING et al.,2004).

Supõe-se que a infecção por *M. haemocanis* em cães não seja um evento raro. A maioria dos cães infectados não apresentam manifestações

clínicas (NOVACCO et al., 2010). Animais portadores de doença esplênica, esplenectomizados, sob ação de drogas imunosupressoras ou co-infectados com vírus, bactérias e outros hemoparasitos podem manifestar a enfermidade (KEMMING et al.,2004).

Os sinais da doença podem se tornar evidentes em 1-2 semanas após a infecção (PRYOR & BRADBURY, 1975) ou com um período de 4-9 semanas (KEMMING et al., 2004). Os sinais clínicos da doença aguda incluem anorexia, letargia, perda de peso e febre e em casos severos a anemia hemolítica pode ser fatal (WEST, 1979). Raramente a doença é descrita em cães imunocompetentes (AUSTERMAN, 1979). Cães imunocompetentes podem ser carreadores crônicos ou assintomáticos até que uma condição como a retirada do baço ou quimioterapia aconteça, nesses casos o episódio agudo pode ocorrer (MESSICK, 2004).

Em princípio, a doença pode ocorrer de duas formas: a forma latente, que geralmente é assintomática e a forma aguda. Os sinais clínicos podem ocorrer rapidamente (1-2 semanas), observa-se anemia grave, leucopenia e também leucocitose. A trombocitopenia é uma observação freqüente em cães portadores de *M. haemocanis* e pode estar associada com doenças de coagulação. Até o momento, não está claro o dano que ocorre nos eritrócitos que estão infectados com *M. haemocanis*. É inegável, porém, que *M. haemocanis* altera severamente a forma dos eritrócitos infectadas e causa anemia (KEMMING et al.,2004).

A Infecção por *Mycoplasma haemocanis*, geralmente, só induz anemia clinicamente significativa em cães esplenectomizados ou imunossuprimidos, porém a infecção latente pode causar anemia sub-clínica (BARKER et al., 2010).

Historicamente, o diagnóstico de *M. haemocanis* depende de esfregaços de sangue periférico, em que *M. Haemocanis* aparece sobretudo na forma de cocos (0,2-0,4 µm). O *M. haemocanis* localiza-se na superfície do eritrócito, é gram-negativo e pode ser visualizado pela coloração Giemsa clássico. No entanto, hoje a técnica mais eficaz de diagnóstico para identificar a presença de *M. haemocanis* é o PCR de sangue total (KEMMING et al.,2004).

Nos últimos 70 anos, o trabalho sobre micoplasmas canina tem sido extremamente limitado, com menos de 50 publicações de micoplasmas em cães. Apesar da duração do tempo desde a descoberta de micoplasmas em cães e a crescente evidência de associação com doenças específicas esses microorganismos ainda não são rotineiramente considerados como causas da infecção em cães, ao contrário de outros mamíferos e répteis. A combinação de fatores como a incapacidade de detectar e identificar micoplasmas caninos, a falta de investigação e a escassez de conhecimentos sobre os micoplasmas em cães contribuem para a falta de informação sobre a patogenicidade, fatores de virulência e história natural deste microorganismo (CHALKER, 2005).

2.6 Trombocitopenia

A trombocitopenia é a diminuição no número de plaquetas e representa a causa mais comum de sangramento espontâneo em cães na clínica de pequenos animais. A trombocitopenia ocorre por: distúrbios na produção, na distribuição ou destruição de plaquetas; aumento do consumo de plaquetas e/ou aumento do seqüestro de plaquetas (THRALL, 2007).

As doenças infecciosas podem contribuir para o desenvolvimento de trombocitopenia através da supressão da produção de plaquetas pela médula óssea, pelo aumento do sequestro esplênico e hepático, aumento da utilização destas ou através da indução simples ou imunomediada das mesmas.

A trombocitopenia é muito comum em cães infectados com *E. canis* (82%), ocorrendo em todas as fases da doença. Na infecção por *A. platys,* parasitemias e posterior episódios de trombocitopenia se repetem em intervalos de 1 a 2 semanas. Dentro de poucos dias após o aparecimento de plaquetas parasitadas, a contagem de plaquetas diminui drasticamente, e os organismos geralmente não são mais vistos (GREENE, 2006).

A trombocitopenia em cães com babesiose é mais frequente que em cães com erliquiose. A trombocitopenia em infecções por *Hepatozoon canis* está presente em aproximadamente um terço dos cães com hepatozoonose (GREENE, 2006).

O efeito da combinação de um agente infeccioso supressor de médula óssea e de drogas que inibam a síntese de proteínas ou de ácidos nucléicos podem ser mais deletério do que a soma dos efeitos de forma independente (GREENE, 2006).

A destruição aumentada de plaquetas representa a causa mais frequente de trombocitopenia em cães. Os três mecanismos mais comuns que provocam destruição periférica de plaquetas são imunomediados, relacionados a drogas (incluindo vacinação com vírus vivos modificados) e relacionados à sepse (NELSON & COUTO, 2006).

Outra causa de trombocitopenia é a remoção acelerada de plaquetas, pela trombocitopenia imunomediada primária, que tem predisposição racial, acomete mais cães das raças Cocker, Old English Sheepdog, Pastor Alemão e Poodle e está associada com a presença de anticorpos anti-plaquetários, que causam destruição acelerada de plaquetas pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário; e a trombocitopenia imunomediada secundária que está associada a condições de base, dentre as quais doenças auto-imunes sistêmicas como o lúpus eritematoso sistêmico, a anemia hemolítica imunomediada, a artrite reumatóide e o pênfigo; neoplasias hematológicas ou metastáticas; doenças infecciosas (erliquiose, FELV, FIV); infecções por protozoários (leishmaniose e babesiose); dirofilariose e histoplasmose (FERREIRA NETO et al., 1981).

Os defeitos na produção podem ser causados por hipoplasia das células hematopoéticas primordiais, substituição da medula normal e trombocitopoese ineficaz. A destruição de plaquetas pode ser aumentada por distúrbios imunológicos ou ainda doenças não imunológicas. Assim como esses distúrbios, problemas na distribuição de plaquetas ou decorrentes de uma transfusão podem ocasionar trombocitopenia (THRALL, 2007).

E por fim a trombocitopenia pode ser causada também pelo seqüestro de plaquetas pelo baço. O baço pode armazenar cerca de 75% das plaquetas circulantes, e em condições de esplenomegalia, pode ocorrer trombocitopenia transitória, assim como em casos de estresse. A endotoxemia pode causar acúmulo de plaquetas no baço. (FERREIRA NETO et al., 1981).

Os animais com trombocitopenia têm tendência a sangramentos mucocutâneos, em geral por muitas vênulas ou capilares, que ocasionam

pequenas hemorragias puntiformes em todos os tecidos corporais denominadas petéquias; e ainda podem apresentar púrpuras (coleções de sangue na pele); equimoses (são características de desordens plaquetárias e representam coleções subcutâneas maiores, devido à perda sangüínea de vênulas e pequenas arteríolas), e hematomas (são mais profundos e palpáveis que as equimoses, sendo comuns em pacientes com defeitos de plaquetas) (REBAR et al., 2003).

Os animais com trombocitopenia não apresentam hemorragia espontânea até que a contagem de plaquetas seja menor ou igual a 10.000 a 50.000 células/µL (THRALL, 2007).

Segundo REBAR et al. (2003), o estabelecimento do diagnóstico é feito por exclusão. Deve-se descartar a pseudotrombocitopenia decorrente da agregação plaquetária, que produz uma falsa contagem baixa de plaquetas. A presença de esplenomegalia sugere a existência de um processo secundário, já a anemia sugere a presença de doença concomitante, devem ser ainda consideradas a exposição a fármacos, infecção, vacinação recente, neoplasias ou transfusão sangüínea.

Atualmente, não há tratamentos específicos para gatos e cães com trombocitopenia. As transfusões de sangue ou de derivados devem ser usados quando indicada (NELSON & COUTO, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Objetivou-se com este trabalho avaliar o envolvimento dos principais hemoparasitos em casos clínicos de trombocitopenia em cães.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar e identificar as espécies de hemoparasitos presentes em cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos por meio do exame parasitológico direto.
- Realizar testes de diagnóstico molecular (PCR) para a detecção específica de infecções por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys, Hepatozoon canis, Mycoplasma haemocanis, Babesia gibsoni, Babesia canis vogeli* e *Theileria equi* em cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos.
- Analisar a relação entre a infecção por hemoparasitos e alterações quantitativas de plaquetas em cães.
- Verificar a concordância entre os métodos de diagnóstico de detecção dos hemoparasitos (exame parasitológico direto x PCR)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período de realização

O projeto foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário (HV) e do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG), durante o período de setembro de 2009 a fevereiro de 2010.

4.2 Grupo de cães utilizados no estudo

Dos cães atendidos para consulta no HV/EV/UFG, no período de execução deste trabalho, foram selecionados 150 amostras de sangue de cães trombocitopênicos e 150 amostras de sangue de cães com o número de plaquetas normais. Resultando em um total de 300 amostras selecionadas para o estudo.

4.3 Exames hematológicos

Como exames hematológicos foram realizados hemogramas completos pelo metódo automatizado (Analizador hematológico, ABC Vet- ABX Company).

No grupo de cães trombocitopênicos foram incluídos os cães com contagens de plaquetas abaixo de 200.000/µL, conforme Meinkoth & Clinkenbeard (2000). Animais com número de plaquetas superior a este valor (>200.000plaquetas/µL) foram, portanto, classificados como não trombocitopênicos.

A contagem de plaquetas foi o único critério utilizado para a seleção das amostras, não sendo levado em consideração outros fatores, como por exemplo raça, sexo ou idade dos animais.

4.4 Colheita de material

Dos cães selecionados para o estudo, foram coletadas amostras de sangue da veia cefálica ou jugular, em tubo esterilizado contendo anticoagulante universal EDTA (Anticoagulante Universal, Doles). Cada amostra foi subdividida em três alíquotas para a realização de exames hematológicos, parasitológicos e moleculares, respectivamente.

4.5 Exame parasitológico direto:

A partir das alíquotas de sangue destinadas ao exame parasitológico foram realizados esfregaços sanguíneos delgados em lâminas. Estas foram fixados pelo metanol por 3 minutos e coradas pelo método de Giemsa (Merck) diluido em tampão Sorensen, segundo CORREA & CORREA (1992).

A identificação dos hemoparasitos foi realizada com base nas características morfométricas espécificas adotados por GREENE (2006) para cada espécie de parasito, ao exame microscópico direto (1000x).

4.5 Extração do DNA genômico das amostras

Das alíquotas de sangue reservadas para o teste molecular foi extraído o DNA total empregando-se o Kit Illustra blood (GenomicPrep Mini Spin Kit GE, healthcare) seguindo instruções do fabricante para um volume de 200 µL da amostra. Os eluatos de DNA obtidos foram devidamente identificados e armazenados a -20º C para posteriormente serem submetidos aos testes moleculares.

4.6 Execução da técnica de PCR

As amostras de DNA obtidas foram submetidas a ensaios de PCR para a identificação genérica de piroplasmídeos (BECK et al., 2009), assim como para identificações espécie-específicas de *E. canis (*ALVES et al., 2005*), Anaplasma platys (*MARTIN et al., 2005*), H. canis* (INOKUMA et al., 2002), *M. haemocanis*

(Comunicação pessoal), *T. equi* (BASHIRUDDIN et al., 1999*), B. gibsoni* (INOKUMA et al., 2004) e para a subespécie- espécifica de *B. c. vogeli* (DUARTE et al., 2008).

4.6.1 Reação de PCR para *Babesia* spp.

O preparo da mistura de reagentes para a execução da técnica de PCR, assim como a programação para os ciclos de temperatura do termociclador foram realizados conforme protocolo descrito por BECK et al., (2009).

Dessa forma foi adotada as seguintes concentrações de reagentes em um volume total de 50 µL: 35,75µL água ultrapura; 5 µL 10X PCR Buffer; 1 µL dNTP 10Mm; 2 µL $MgCl_2$; 0,5 µL de cada *primer* (20 pmole/µL); 0,25 µL *Taq*DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen) e 5 µL da amostra de DNA testada.

Nesta fase o DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de sequências alvo de aproximadamente 560pb de qualquer espécie de piroplasmídeo. Para tal fim utilizaram-se *primers* gênero-específicos para piroplasmídeos *Babesia* gênero e/ou *Theileria* gênero: BECKF (*forward*) (5'- GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG - 3') e BECKR (*reverse*) (5'- CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC- 3').

As amostras positivas utilizando os primers genéricos BECKF e BECKR foram então testadas com primers espécie-específico: GIB599F (*foward*) (5'-CTC GGC TAC TTG CCT TGT C -3') e GIB1270R (*reverse*) (5'- GCC GAA ACT GAA ATA ACG GC -3'), para obtenção de um produto específico de 665pb de *B. gibsoni* (INOKUMA et al., 2004); BEQF (*foward*) (5'- CAT CGT TGC GGC TTG GTT GG -3') e BEQR (*reverse*)(5'- CCA AGT CTC ACA CCC TAT TT -3'), para um produto específico de 664pb de *T. equi* (BASHIRUDDIN et al., 1999); BAB1 (*foward*) (5'-GTG AAC CTT ATC ACT TAA AGG-3') e BAB4 (*reverse*) (5'-CAA CTC CTC CAC GCA ATC G-3'), para um produto específico de 590pb de *B. c. vogeli* (DUARTE et al., 2008).

O programa de amplificação para a identificação de sequências genéticas condizentes com o gênero *Babesia* e/ou *Theileria* utilizando as sequências iniciadoras BECKF/ BECKR consistiu de um passo inicial de desnaturação por 2 minutos a 94ºC, seguido de 40 ciclos repetidos com as

temperaturas de 94ºC por 30 segundos, anelamento a 53ºC por 30 segundos e extensão a 72ºC por um minuto, finalizando-se com um ciclo extra de extensão a 72ºC por 5 minutos.

O programa de amplificação das sequências genéticas específicas para *B. gibsoni* utilizando as sequências iniciadoras GIB599F/ GIB1270R consistiu em uma etapa com ciclo inicial de desnaturação a 94ºC/ 2 minutos, seguido por 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94ºC/ 1 minuto, anelamento a 55ºC/ 1 minuto, extensão a 72ºC/ 2 minuto, finalizando com uma extensão extra a 72ºC/ 5 minutos. Para *T. equi* o programa de amplificação das sequências genéticas específicas utilizando as sequências iniciadoras BEQF/ BEQR consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94ºC por 5 minutos, seguido de 30 ciclos repetidos com as temperaturas de 94ºC por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72 ° C por 30 segundos, finalizando-se com o adicional de extensão de 72ºC por 2 minutos. E para *B. c. vogeli* o programa de amplificação utilizando as sequências iniciadoras BAB1/BAB4 consistiu de uma desnaturação inicial a 94ºC/ 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 94ºC/ 30 segundos, anelamento a 55ºC/ 30 segundos, extensão 72ºC/ 1 minuto, finalizando com uma extensão adicional a 72ºC/ 5 minutos.

Para a certificação da eficácia da PCR, bem como para monitorar qualquer possível contaminação durante o processamento do material, foram utilizadas algumas amostras controle. Para efeito de documentação, utilizaram-se apenas os controles positivo e negativo.

Como controle positivo, foi utilizado amostra de referência de *B. gibsoni, T. equi e B. c. vogeli* procedentes do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias da EV/UFG. O controle positivo visou, acima de tudo, confirmar a validade dos resultados obtidos. Como controle negativo, utilizou-se água ultra-pura.

4.6.2 Reação de PCR para *E. canis*

Para o preparo da mistura dos reagentes adotou-se o protocolo previamente estabelecido por ALVES et al. (2005), com pequenas modificações quanto ao fabricante da *Taq* DNA polimerase e do $MgCl_2$ e, consequente, ajuste na quantidade de água para manter o volume total do mix de reação em 50 µL.

Dessa forma foram adotadas as seguintes concentrações de reagentes em um volume total de 50 µL: 35,75µL de água ultrapura; 5 µL 10X PCR Buffer; 1 µL de dNTP 10Mm; 2 µL de $MgCl_2$; 0,5 µL de cada primer (20 pmole/µL); 0,25 µL de *Taq*DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen) e 5 µL da amostra de DNA testada.

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de sequências genéticas de *E. canis.* Para tal fim utilizaram-se sequências iniciadoras ou "primers" espécie específica de *E. canis*: EBR1 (5'-CCT CTG GCT ATA GGA AAT TG- 3') e EBR5 (5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G- 3');

Para este teste de PCR , o tamanho do fragmento amplificado foi de 765pb, específico do gene 16S rRNA de *E. canis*.

Para o processo de amplificação por PCR, os ciclos e as temperaturas foram definidos de acordo com adaptações de ALVES et al. (2005), estabelecendo-se as seguintes condições: desnaturação inicial a 94ºC por dois minutos, seguido de 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94ºC por 30 segundos, 53ºC por 30 segundos e 72ºC por um minuto, finalizando-se com um ciclo extra de extensão a 72ºC por 5 minutos.

Como controle positivo, foi utilizado amostra de referência ECG01 de *E. canis,* procedentes do Laboratório de Diagnóstico de Doenças parasitárias da EV/UFG. Como controle negativo do *mix*, utilizou-se água ultra-pura.

4.6.3 Reação de PCR para *A. platys*

O protocolo para o preparo da mistura de reagentes, utilizado para a execução da técnica de PCR, foi adaptada de MARTIN et al. (2005), como segue: 35,75µL água ultrapura; 5 µL 10X PCR Buffer (Invitrogen); 1 µL dNTP 10Mm; 2 µL $MgCl_2$; 0,5 µL de cada primer; 0,25 µL *Taq*DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen) e

5 µL da amostra de DNA testada, alcançando-se assim o volume total de 50 µL para o *mix*.

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de sequências genéticas específicas de *A. platys.* Para tal fim utilizou-se o par de primers espécie-específico: PLATYSF (5'-GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG-3') e EHR16SR (5'- TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC -3'). O produto obtido para esta reação foi um fragmento de 678pb do gene 16S rRNA de *A. platys.*

O programa de amplificação empregado nesta etapa consistiu de um passo inicial de desnaturação a 94ºC por 2 minutos, seguido de 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94ºC por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando-se com o adicional de extensão de 72ºC por 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado um isolado de referência para *A. platys* do Laboratório de Diagnóstico de Doenças parasitárias da EV/UFG, e como controle negativo do *mix*, utilizou-se água ultra-pura.

4.6.4 Reação de PCR para *H. canis*

A mistura de reagentes para ensaios de PCR foi realizada sob condições de adaptações dos protocolos descritos por INOKUMA et al. (2002) e seguiu as seguintes concentrações: 35,75 µL de água ultra-pura; 5 µl 10 x PCR Buffer (Invitrogen); 2,0 µL MgCl2 50 mM (Invitrogen); 1 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL (20 pM / µL) de cada primer; 0,25 µL Taq DNA polimerase 5 U/µL (Invitrogen) e 5 µL de DNA extraído das amostras testadas.

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de sequências genéticas de *H. canis.* Para tal fim utilizarou-se o par de *primers* espécie-específico: HEPF (5'-ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC-3') e HEPR (5'-CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG-3'). O produto alvo obtido para a reação foi um fragmento de 666 pb do gene 18S rRNA de *H. canis.*

Os ciclos de temperaturas foram definidos de acordo com adaptações a partir de INOKUMA et al. (2002), da seguinte forma: um ciclo inicial de desnaturação a 94ºC/ 2 minutos, seguido por 35 ciclos repetidos com as

temperatudas de 94ºC/ 30 segundos, 52ºC/ 30 segundos, 72ºC/ 1 minuto, finalizando com uma extensão extra a 72ºC/ 3 minutos.

Foi utilizado como controle positivo, um isolado de referência para *H. canis* obtido junto ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças parasitárias da EV/UFG. Como controle negativo utilizou-se água ultra-pura.

4.6.5 Reação de PCR para *M. haemocanis*

O preparo da mistura de reagentes para o teste de PCR para *M. haemocanis* foi realizado conforme LINHARES (comunicação pessoal), com a seguinte composição: 35,75µL água ultrapura; 5 µL 10X PCR Buffer (Invitrogen); 1 µL dNTP 10Mm; 2 µL $MgCl_2$; 0,5 µL de cada primer, 0,25 µL *Taq*DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen) e 5 µL da amostra de DNA a ser testada, completando assim o volume total do mix = 50 µL.

O DNA extraído de cada amostra foi testado para a presença de sequências genéticas de *M. haemocanis.* Para tal fim utilizarou-se primers espécie-específico para *M. haemocanis,* GAU24 (5'-GGA TAA TTA TGA TAG TAC TTC GT-3') e GAU37 (5'- GGT TTG CAA CAC ATT GTG TTC-3'). O produto obtido para esta reação foi um fragmento de 768pb do gene 16S rRNA de *M. haemocanis.*

Para a amplificação por PCR, adotou-se os seguintes ciclos e condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94ºC por 2 minutos, seguido de 40 ciclos repetidos com as temperaturas de 94ºC por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, finalizando-se com o adicional de extensão de 72ºC por 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado um isolado de referência para *M. haemocanis* proveniente do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade de Purdue (West Lafayette/EUA) e como controle negativo do *mix*, utilizou-se água ultra-pura.

4.7 Leitura e documentação da reações de PCR

Os produtos de DNA amplificados (*amplicons*) foram detectados após eletroforese em gel de agarose a 1,2% (Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TBE1x. Um volume de 10 µL dos produtos de PCR, homogeneizados em 2,5 µL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 025% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em 9 partes de glicerol) foram aplicados em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado 5 µg do marcador (DNA Ladder 100pb Invitrogen). As eletroforeses foram conduzidas em cuba (Horizon 11.14, Life Technologies), a 90 V, durante 60 minutos. Após as corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) por 10 minutos.

As leituras foram realizadas por visualização sob luz ultravioleta, em transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum). A documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi realizada em equipamento fotodocumentador de géis (Vilber Lourmat) e armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de software processador de imagens (PhotoCapt, Viber Lourmat).

4.8 Análise estatística

Os dados referentes aos resultados dos exames laboratoriais foram organizados e submetidos à avaliações quantitativas, analisados em tabelas de contingência, segundo os tratamentos utilizados. A dispersão de freqüência obtida foi testada pelo qui-quadrado (X^2) ou Teste exato de Fisher para verificação de possíveis associações entre cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos com as infecções por hemoparasitos. Os fatores avaliados também foram relacionados utilizando-se o teste de Odds Ratio.

Foi verificado a correlação entre os testes de diagnóstico empregados para a detecção de hemoparasitos (exame parasitológico direto x PCR), utilizando o teste de McNEMAR para analisar a concordância dos resultados obtidos pelo exame parasitológico direto com os ensaios de PCR realizados nas mesmas amostras. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Bioestat 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Exame parasitológico direto

Verificou-se pelo exame parasitológico direto uma frequência de *E. canis, A. platys*, piroplasmídeos, *Hepatozoon* sp., respectivamente, em 4,33% (13/300), 2,67% (8/300), 3%(9/300) e 1% (3/300) do total de cães avaliados. *M. haemocanis* não foi identificado em nenhum dos animais avaliados por este método de diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de infecção por hemoparasitos em cães trombocitopênicos (n=150) e não trombocitopênicos (n=150) atendidos no HV/EV/UFG e avaliados pelo exame parasitológico direto.

Agente etiológico	Trombocitopênico N = 150		Não trombocitop. N = 150		TOTAL N = 300	
	Frequência		Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Abs	Relat
Ehrlichia canis	10	6,66%	3	2%	13	4,33%
Anaplasma platys	5	3,33%	3	2%	8	2,67%
Piroplasmídeo	8	5,33%	1	0,67%	9	3%
Hepatozoon sp.	1	0,67%	2	1,33%	3	1%
Mycoplasma haemocanis	0	0%	0	0%	0	0%

Dentre o grupo de cães trombocitopênicos (n=150), a frequência total de animais positivos para *E. canis* foi identificada em 6,66% (10/150), *A. platys* em 3,33% (5/150), piroplasmídeo em 5,33% (8/150) e *Hepatozoon* sp. em 0,67% (1/150) (Tabela 1).

Já no grupo de cães não trombocitopênicos (n=150), a frequência total de cães positivos para *E. canis* foi identificada em 2% (3/150), *A. platys* em 2% (3/150), piroplasmídeo em 0,67% (1/150) e *Hepatozoon* sp. em 1,33% (2/150) (Tabela 1).

A frequência de piroplasmídeos identificados através do exame parasitológico direto no grupo de cães trombocitopênicos foi maior que a frequência obtida no grupo de cães não trombocitopênicos do presente estudo (p-valor = 0,0363).

5.2 Testes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Identificou-se pela PCR a presença dos hemoparasitos *E. canis, A. platys, H. canis, M. haemocanis* e *B. c. vogeli* em cães atendidos no HV/EV/UFG na cidade de Goiânia, incluídos no presente estudo. Não foram identificadas infecções por *Babesia gibsoni* e/ou *Theileria equi* nos cães avaliados (Tabela 2).

As frequências totais obtidas através do PCR para infecção por *E. canis, A. platys, B. c. vogeli, H. canis* e *M. haemocanis* foram, respectivamente, de 42,66% (128/300), 6% (18/300), 5% (15/300), 3% (9/300) e 2,34% (7/300) do total de cães avaliados neste estudo.

Tabela 2. Frequência de infecção por hemoparasitos em cães trombocitopênicos (n=150) e não trombocitopênicos (n=150) atendidos no HV/EV/UFG e avaliados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Agente etiológico	Trombocitopênico N = 150		Não trombocitop. N = 150		TOTAL N = 300	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa	Frequência Absoluta	Frequência Relativa	Frequência Abs	Frequência Rel
Ehrlichia canis	107	71,33%	21	14%	128	42,66%
Anaplasma platys	13	8,67%	5	3,33%	18	6%
Babesia canis vogeli	14	9,33%	1	0,67%	15	5%
Babesia gibsoni	0	0%	0	0%	0	0%
Babesia equi	0	0%	0	0%	0	0%
Hepatozoon canis	3	2%	6	4%	9	3%
Mycoplasma haemocanis	5	3,33%	2	1,33%	7	2,34%

Dentre o grupo dos trombocitopênicos (n=150), a frequência total de cães PCR positivos para *E. canis* foi de 71,33% (107/150), *A. platys* em 8,67% (13/150), *Babesia canis vogeli* em 9,33% (14/150), *H. canis* em 2% (3/150) e *Mycoplasma haemocanis* em 3,33% (5/150) (Tabela 2).

Já no grupo dos não trombocitopênicos (n=150), a frequência de cães PCR positivos *E. canis* foi de 14% (21/150), *A. platys* 3,33% (5/150), *Babesia canis vogeli* 0,67% (1/150), *H. canis* em 4% (6/150) e *Mycoplasma haemocanis* em 1,33% (2/150).

Dos 300 cães avaliados no estudo, 149 cães foram positivos no PCR para um ou mais hemoparasitos, em que 78,67%(118/150) dos cães do grupo

trombocitopênicos e 20,67%(31/150) dos cães do grupo dos não trombocitopênicos foram PCR positivos para um ou mais hemoparasitos.

Observou-se a presença dos hemoparasitos *E. canis, A. platys, H. canis, M. haemocanis* e *a subespécie B. c. vogeli* tanto no grupo de cães trombocitopênicos como no grupo de cães não trombocitopênicos.

A frequência de *E. canis* e *B. c. vogeli* no grupo de cães trombocitopênicos foi estatisticamente superior a frequência no grupo de cães não trombocitopênicos (p< 0,001; p=0,0007) (Figura 2).

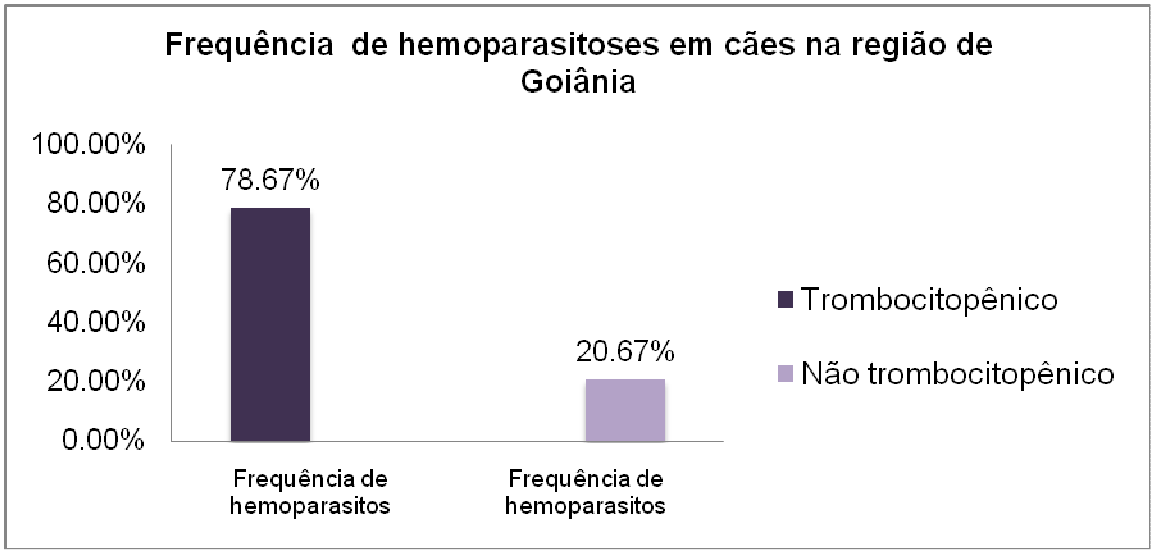

Figura 1. Frequência (%) da infecção por hemoparasitos identificadas pela PCR em cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos atendidos no HV/EV/UFG da cidade de Goiânia.

Dentre as hemoparasitoses observadas e identificadas através de exame parasitológico direto e/ou ensaios de PCR nos cães avaliados, a infecção por *E. canis* foi a de maior frequência, acometendo um total de 71,33% (107/150) no grupo de cães trombocitopênicos, enquanto que no grupo de cães não trombocitopênicos a frequência foi de apenas 14% (21/150).

A trombocitopenia verificada neste estudo foram positivamente relacionadas à infecção por *E. canis*. Cães com infecção por *E. canis* possuem uma probabilidade 14 vezes superior de apresentarem trombocitopenia (p< 0,0001).

Ao avaliar somente os cães positivos para *E. canis* (n=128), verificou-se que 83,60% (107/128) dos resultados PCR- positivos para *E. canis* estavam

dentro do grupo de animais trombocitopênicos e apenas 16,40% (21/128) estavam dentro do grupo de cães não trombocitopênicos, caracterizando uma maior ocorrência da doença entre cães trombocitopênicos.

A frequência de *A. platys* no grupo de cães trombocitopênicos 8,67% (13/150) foi maior que a frequência observada no grupo de cães não trombocitopênicos 3,33% (5/150), porém a análise entre as frequências obtidas não demonstraram diferença estatística significativa (p-valor= 0,0863).

A frequência de *B. c. vogeli* no grupo de cães trombocitopênicos 9,33%(14/150) deste estudo, foi maior que a frequência observada no grupo de cães não trombocitopênicos 0,66% (1/150) (p-valor =0,0007). Cães com infecção por *B. c. vogeli* possuem uma probabilidade 15 vezes superior de apresentarem trombocitopenia (p=0,0015).

A frequência de *H. canis* em cães trombocitopênicos foi de 2% (3/150). Enquanto que a frequência de *H. canis* em cães não trombocitopênicos foi de 4% (6/150). Embora a frequência de *H. canis* em cães não trombocitopênicos tenha sido maior que a obtida em cães trombocitopênicos, não houve diferença estatística entre a frequência dentro do grupo de cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos (p-valor= 0,50).

A frequência de *M. haemocanis* no grupo de cães trombocitopênicos foi de 3,33% (5/150). Já no grupo de cães não trombocitopênicos a frequência de *M. haemocanis* foi de 1,33% (2/150).

Faz-se necessário o estudo de um número de casos positivos maior que o obtido neste estudo para *H. canis* e *M. haemocanis* a fim de se obter uma conclusão mais fidedigna sobre a presença ou a ausência de trombocipenia em cães com infecções por *H. canis* e *M. haemocanis.*

5.3 Relação entre infecções por *Ehrlichia canis* e intervalos de plaquetometria em animais trombocitopênicos

Ao se comparar a frequência de animais positivos para *E. canis* agrupados de acordo com o grau de trombocitopenia (n=107) pôde-se observar uma frequência maior em cães com valores de plaquetas inferiores a 50.000/mm^3 de sangue (95%; 19/20) do que em cães com valores de plaquetas entre 50.000 a

199.000/mm^3 de sangue (67,7% 88/130) (p-valor 0,0088) (Tabela 3). Dentre o grupo de cães trombocitopênicos e PCR positivos para *E. canis* (n=107), 79,44% (85/107) apresentaram infecção infecção simples para *E. canis* e 20,56% (22/107) apresentaram infecção mista de *E.canis* com outros hemoparasitos avaliados.

Os resultados de cães trombocitopênicos que apresentaram infecção mista (n=22) para *E. canis* não foram analisados isoladamente, pois o número de amostras dentro de cada faixa de plaquetometria foi inferior ao necessário para análise estatística.

Tabela 3. Relação estatística dos resultados PCR-positivos para *E. canis* dentro do grupo de animais trombocitopênicos, analisando-se diferentes faixas de plaquetometria.

Faixas de plaquetometria / mm^3 de sangue	*E. canis* (infecção simples e mista)			*E.canis* (somente Infecção simples)		
	Pos	Neg	p- valor	Pos	Neg	p- valor
50.000 a 199.000 (130)	88	42	0,0088	70	42	0,0115
<50.000 (20)	19	1		15	1	
100.000 a 199.000 (94)	64	30	0,2702	53	30	0,4395
<100.000 (56)	43	13		32	13	
150.000 a 199.000 (57)	38	19	0,3555	30	19	0,3425
< 150.000 (93)	69	24		55	24	

O grau de trombocitopenia com valores de trombocitopenia severa (<50.000 plaquetas/mm^3 de sangue) demonstrou ser um indicador de infecção tanto para a infecção de *E. canis* simples e mista (p-valor = 0,0088), quanto para a infecção simples de *E. canis* (p-valor = 0,0115).

Não foram realizados testes estatísticos com os resultados PCR-positivos para os demais hemoparasitos avaliados analisando-se as diferentes faixas de plaquetometria, pois o número de amostras positivas dentro de cada faixa de plaquetometria ficou muito reduzido. Dessa forma, faz-se necessário analisar um número maior de amostras positivas para os demais hemoparasitos avaliados dentro de cada faixa de plaquetometria a fim de concluir, de forma definitiva, a influênca do grau de trombocitopenia como um fator sugestivo ou não de infecção por hemoparasitos.

5.4 Exame parasitológico direto x PCR

O teste de McNemar foi aplicado nos dados obtidos a partir da comparação dos resultados dos testes de diagnóstico empregados, avaliando-se o grau de concordância dos dois tratamentos a que foram submetidos os mesmos cães.

Tabela 4. Comparação da eficiência entre os Métodos de diagnóstico empregados: exame parasitológico direto e PCR, utilizando como análise estatística o teste de McNemar

	Métodos de exames		
Agente Etiológico	**Parasitológico Direto**	**PCR**	**McNemar**
E. canis	13	128	P<0,0001
A. platys	8	18	P=0,0020
Piroplasmídeo	9	15	P=0,0313
H. canis	3	9	P=0,0313
M. haemocanis	0	7	P=0,0156
TOTAL	33	177	P<0,0001

Os resultados obtidos pelos métodos de diagnóstico empregados: (parasitológico direto e PCR) demonstraram diferença estatística para a detecção de *E. canis, A. platys*, piroplasmídeo*, H. canis* e *M. haemocanis* (Tabela 4) . Todos os cães positivos no exame parasitológico direto para os hemoparasitos avaliados também foram positivos nos ensaios de PCR. A PCR foi mais sensível, sendo, portanto considerado o método mais confiável para o diagnóstico das principais hemoparasitoses de cães avaliadas neste estudo.

A frequência dos hemoparasitos avaliados obtida através do exame parasitológico direto foi bem menor que a verificada através do PCR (p< 0,0001). Apenas 18,64% (33/177) de todos os resultados PCR positivos para hemoparasitos também foram positivos no exame parasitológico direto. Este percentual indicou um menor potencial de detecção para o exame parasitológico direto como método de diagnóstico. O uso de duas técnicas de diagnóstico em uma mesma amostra aumentou a confiabilidade dos resultados.

5.5 Infecções associadas entre *Ehrlichia canis* e outros hemoparasitos

Foram identificadas infecções mistas entre os hemoparasitos avaliados em 8,66% (26/300) do total de cães analisados. Em todas as infecções mistas observadas neste estudo (n=26), foram identificadas a presença de *E. canis* associada a um ou mais hemoparasitos.

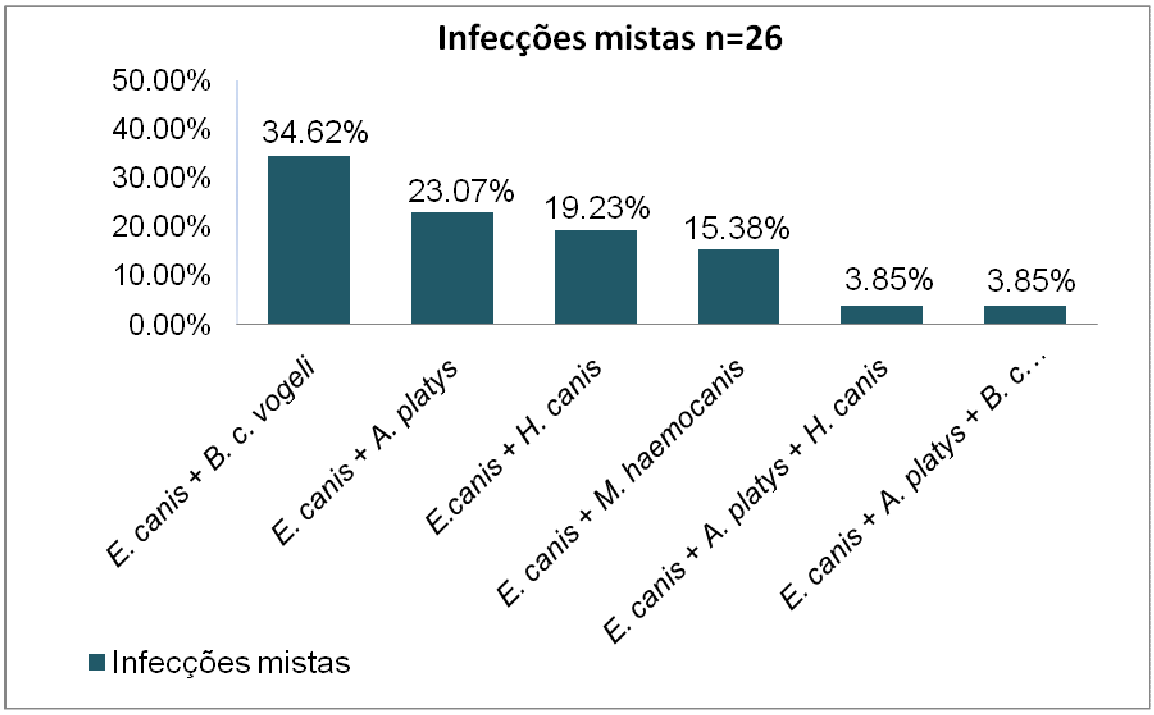

Figura 2. Ocorrência de infecção mista entre os hemoparasitos avaliados em cães atendidos no HV/EV/UFG na cidade de Goiânia.

Dentre os cães PCR positivos, 17,45% (26/149) apresentaram infecções mistas entre os hemoparasitos avaliados.

A infecção mista de *E. canis* com *B. c. vogeli* foi a associação de maior ocorrência, ocorrendo em 34,62% (9/26) das infecções mistas observadas. Ao comparar o total de cães avaliados (n=300), o percentual desta associação foi de 3% (9/300).

Infecções mistas de: *E. canis* com *A. platys; E. canis* com *H. canis* e *E. canis* com *M. haemocanis* ocorreram, respectivamente em, 23,07% (6/26), 19,23% (5/26), 15,38% (4/26) do total de casos de infeções mistas deste estudo.

Tabela 5. Ocorrência de infecções mistas por hemoparasitos em cães trombocitopênicos (n=150) e não trombocitopênicos (n=150) no HV/EV/UFG, na cidade de Goiânia, através da PCR.

INFECÇÕES MISTAS	Trombocitop.		Não trombocit.		TOTAL	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
E. canis + *Babesia c. vogeli*	8	142	1	149	9	291
E. canis + *A. platys*	6	144	0	150	6	294
E. canis + *M. haemocanis*	4	148	0	150	4	298
E.canis + *H. canis*	2	146	3	147	5	293
E. canis + *A. platys* + *H. canis*	1	149	0	150	1	299
E. canis + *A. platys* + *B. c. vogeli*	1	149	0	150	1	299
TOTAL	22	128	4	146	26	274

As co-infecções de *E. canis* com *A. platys* e *E. canis* com *M. haemocanis* foram observadas somente no grupo de cães trombocitopênicos e corresponderam, respectivamente, a 27,27% (6/22) e 18,18% (4/22) do total de casos de infecção mista encontrada em cães trombocitopênicos (Tabela).

A frequência de infecção mista no grupo de cães trombocitopênicos 14,66% (22/150) foi maior que no grupo de cães não trombocitopênicos 2,66% (4/150) (p-valor= 0,0003). Cães com infecção mista possuem uma probabilidade 6 vezes superior de apresentarem trombocitopenia (p-valor = 0,0005).

6. DISCUSSÃO

A frequência de hemoparasitos obtida neste estudo utilizando como método de diagnóstico o exame parasitológico direto foi bem menor que a frequência encontrada utilizando ensaios de PCR (p-valor < 0,0001). Corroborando com resultados descritos na literatura. O exame parasitológico direto embora seja um exame altamente conclusivo para o diagnóstico das hemoparasitoses, apresenta pouca sensibilidade devido ao nível de parasitemia flutuante do agente etiológico, mesmo em casos de doença clínica, principalmente nas fases crônicas (GREENE, 2006).

Na erliquiose monocítica canina, a identificação de mórulas no esfregaço sanguíneo é difícil, sendo encontradas apenas nas duas primeiras semanas da infecção e em pequenas quantidades, devido à baixa parasitemia e a porcentagem de células infectadas raramente ultrapassarem 1%. Os valores encontrados em amostras de esfregaços sanguíneos podem ser inferiores aos encontrados através de outras técnicas de diagnóstico, como demonstra o trabalho de O'DWYER (2000), pois em infecções subagudas ou crônicas, a parasitemia é muito baixa, e o diagnóstico deve ser realizado através de outros testes de diagnóstico. A visualização de mórulas de *E. canis* nos monócitos é observada em apenas 4% dos casos de erliquiose (HARRUS & WANER, 2010). Fato também relatado em estudo realizado em Jaboticabal (3,3%) (NAKAGHI et al., 2008).

No Brasil, frequências de hemoparasitos superiores a obtida neste estudo foram descritos por SALGADO (2006), cuja frequência obtida para os principais hemoparasitos caninos foi de 62,2% (103/167). A maior ocorrência de hemoparasitos descrita por este pesquisador pode ser justificada pelo fato de os cães avaliados do referido estudo serem procedentes do Centro de Controle de Zoonoses, local onde existe uma elevada aglomeração de animais, com alto grau de debilidade, maior infestação por carrapatos e, portanto, maiores chances de adquirir e manifestar as hemoparasitoses.

A frequência de *E. canis* obtida pelo exame parasitológico direto e/ou PCR de 42,66% (128/300) deste estudo foi semelhante à relatada por DA SILVA

et al. (2010), que obteve uma fequência de 42% em cães domiciliados em Cuiabá (MT), estando acima das relatadas por outros autores no Brasil: 23% no Paraná (TRAPP et al., 2006a), 36% na Bahia (CARLOS et al., 2007) e 27,9% em Brasília (CESAR et al., 2008). Entretanto, foi inferior ao resultado de SALGADO (2006), que observou pelo esfregaço sanguíneo, uma frequência de *E. canis* de 60,48% nos cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS).

Frequência semelhante a deste trabalho para *A. platys* foi descrita por COSTA JUNIOR (2007), que relatou uma frequência de 5,10% ao estudar cães de áreas urbanas e 11,69% ao estudar cães de áreas rurais das microrregiões de Belo Horizonte, Lavras e Nanuque no Estado de Minas Gerais.

ACETTA et al., (2008) relataram uma frequência de *A. platys* (2,57%) inferior ao obtido neste estudo. A baixa frequência descrita por estes pesquisadores provavelmente está relacionada ao emprego de apenas um método de diagnóstico, o exame parasitológico direto, o qual possui como desvantagem a baixa sensibilidade em casos subagudos e crônicos da doença.

A frequência de *H. canis* neste estudo foi de 3%. Frequência semelhante foi descrito por SALGADO (2006), o qual verificou uma ocorrência de *H. canis* de 2,4% (2/167) ao analisar cães oriundos de área urbana. 33,33% dos cães positivos para *H. canis* neste estudo apresentaram trombocitopenia, este dado corrobora com o descrito na literatura, em que anormalidades hematológicas como a trombocitopenia é identificada em aproximadamente um terço dos cães com hepatozoonose canina (GREENE, 2006).

KEMMING et al., (2004) demonstraram frequências superiores a encontradas neste estudo de *M. haemocanis*, ao estudar 3 canis comerciais, localizados no leste europeu, oeste europeu e um nos Estados Unidos cuja frequência de *M. haemocanis* obtidas foram respectivamente, de 30, 35 e 87%. Esses resultados demonstraram que possivelmente trata-se de uma doença comum em animais de canis comerciais.

A micoplasmose canina já foi descrita em diferentes regiões dos Estados Unidos e Europa (SYKES et al., 2003; TASKER et al., 2003; KENNY et al., 2004). Estudos recentes utilizando técnicas moleculares para a detecção de micoplasmas hemotróficos em diferentes mamíferos têm sido conduzidos no

Brasil. Em gatos domésticos, infecções por *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus M. haemominutum'* e '*Candidatus M. turicensis'* foram identificadas. Dois hemoplasmas caninos, *Mycoplasma haemocanis* e '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum'*, foram identificados em cães domésticos. Infecção por um hemoplasma em um paciente humano infectado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi recentemente documentada (BIONDO et al., 2009).

Espécies de hemoplasmas são comuns e importantes agentes de infecções no Brasil. Estudos futuros devem ser conduzidos para melhor entender seu impacto em cães e gatos, e também para determinar o seu papel como agentes zoonóticos, particularmente em pacientes imunocomprometidos (BIONDO et al., 2009).

Considerando-se que o *R. sanguineus* é transmissor de outros hemoparasitos, é relativamente comum encontrar infecções mistas causadas por *A. platys, B. canis, H. canis* e *M. haemocanis*. Entretanto, dificilmente diferenciam-se clinicamente as infecções simples daquelas mistas. A infecção concomitante de *E. canis* com outros hemoparasitos provoca alterações hematológicas variáveis e frequentemente é observado um agravamento do quadro clinico do animal (YABSLEY et al., 2008).

A cidade de Goiânia apresenta condições de temperatura e umidade que favorecem a transmissão das principais hemoparasitoses caninas, pois possui um clima propício ao desenvolvimento de várias espécies de carrapatos, as quais são vetores de várias hemoparasitoses caninas. De acordo com LOULY et al. (2007), o número médio de carrapatos *R. sanguineus* encontrados na estação seca e chuvosa não diferem estatisticamente, verificando-se uma alta prevalência deste carrapato durante o ano inteiro. A alta e constante ocorrência deste vetor na região de Goiânia contribui para a manutenção dos hemoparasitos caninos na região.

A trombocitopenia canina é uma alteração comum nos achados laboratoriais de cães parasitados por hemoparasitas corroborando com os achados de BULLA et al. (2004), que confirmaram através do Nested PCR que 98,5% (66/67) dos cães positivos para *E. canis* eram trombocitopênicos. FERNANDES et al. (2008), ao analisarem cães positivos para *E. canis* verificaram que 87% dos casos positivos apresentaram, trombocitopenia.

Resultados deste estudo demonstraram uma ocorrência de hemoparasitos maior em cães trombocitopênicos, que em cães não trombocitopênicos. MACIEIRA et al. (2005), relataram que 88,23% dos resultados PCR-positivos para *E. canis* estavam dentro do grupo de cães trombocitopênicos e apenas 11,17% estavam dentro do grupo de cães não trombocitopênicos. A contagem de plaquetas em valores normais não exclui a presença da doença, estes resultados sugerem que é menos provável que os cães com contagem de plaquetas normais estejam infectados com *E. Canis*. CESAR et al. (2008) obtiveram uma alta ocorrência de infecção por *E. canis* (66%) ao estudar uma população hospitalar de cães trombocitopênicos de Brasilia.

A trombocitopenia tem sido, constantemente relatada em todas as fases da infecção por *E. canis*. As alterações hematológicas tem sido melhor documentadas para as infecções causadas por *E. canis* e constantemente inclui trombocitopenia (82%) (GREENE, 2006). Cães na fase subclínica geralmente apresentam trombocitopenia leve, no entanto, apesar de cães na fase aguda apresentarem trombocitopenia ligeira, eles são mais propensos a mostrar graves trombocitopenias, assim como cães na fase crônica (WANER et al., 1997). Novos estudos envolvendo um maior número de amostras são necessários para fornecer dados mais confiáveis e fidedignos a respeito da presença de trombocitopenia e das alterações do grau de trombocitopenia provocadas pela infecção mista de dois ou mais hemoparasitos.

Os resultados deste estudo sugerem que o uso da contagem de plaquetas como teste de triagem para a presença de uma infecção por *E. canis* em cães em uma área endêmica pode ser uma ferramenta viável para orientar novos procedimentos de diagnóstico. BULLA et al., (2004), ao analisarem somente os cães positivos para *E. canis* (67/217), relataram que 79,1% das amostras positivas pertenciam ao grupo de cães com trombocitopenia moderada a grave (menos de 100.000 plaquetas/µL). Resultados divergentes foram relatados por MACIEIRA et al., (2003), que concluiram que o grau de trombocitopenia não é um indicador preciso da infecção por *E. canis*, no entanto, é importante ressaltar que estes pesquisadores analisaram um número de amostras positivas para *E. canis* (n=30) menor que o número analisado por BULLA et al. (2004) (n=67) e bem menor que o número analisado neste estudo

(n=107), e dessa forma, uma análise estatística mais conclusiva não foi obtida por este pesquisador, uma vez que o número de amostras dentro de cada intervalo ficou reduzido.

Várias doenças podem resultar em trombocitopenia. Estes incluem trombocitopenia imunomediada, processos neoplásicos, doenças inflamatórias ou infecção por outros agentes. Nenhuma dessas doenças podem ser eliminadas do exame uma vez que a trombocitopenia for identificada, mesmo em um área endêmica. No entanto, com base na análise dos resultados obtidos, a infecção por *E. canis* deve ser incluída rotineiramente no diagnóstico diferencial quando a trombocitopenia for identificada em um cão residente em uma área endêmica.

Tendo em vista a frequência de 95% para *E. canis* em cães com trombocitopenia severa encontradas neste estudo, sugere-se que cães com trombocitopenia severa (<50.000 plaquetas/µL) são bons candidatos para infecção por *E. canis*, especialmente em uma área endêmica. Estes dados reforçam o conceito de que contagem de plaquetas podem ser um bom teste de rastreio para erliquiose monocítica canina, e que a magnitude da trombocitopenia pode aumentar a confiabilidade do diagnóstico.

A frequência de *B. c. vogeli* neste estudo em cães trombocitopênicos foi superior a de cães não trombocitopênicos (p-valor= 0,0007), dados semelhantes foram descritos na literatura, em que as principais anormalidades hematológicas primárias encontradas em cães com babesiose são a anemia e a trombocitopenia. A frequência de trombocitopenia em cães com babesiose foi maior que a frequência encontrada em cães com erliquiose neste estudo, fato também relatado por GREENE (2006).

A frequência de infecção mista de *E. canis* com outros hemoparasitos avaliados corrobora com os dados encontrados na literatura. Considerando-se que o *R. sanguineus* é transmissor de outros hemoparasitos, é relativamente comum encontrar infecções mistas causadas por *A. platys, B. canis, H. canis* e *M. haemocanis*. Entretanto, dificilmente diferenciam-se clinicamente as infecções simples daquelas mistas. A infecção concomitante de *E. canis* com outros hemoparasitos provoca alterações hematológicas variáveis e frequentemente é observado um agravamento do quadro clinico do animal (YABSLEY et al., 2008).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos deste estudo pôde-se confirmar a ocorrência de *Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia canis vogeli, Hepatozoon canis e Mycoplasma haemocanis* em cães na Região de Goiânia. Não foram identificadas infecções por *Babesia gibsoni* e/ou *Theileria equi* nos cães avaliados.

A ocorrência de *E. canis* e *B. c. vogeli* foi maior em cães trombocitopênicos do que em cães não trombocitopênicos. Não houve diferença significativa entre a ocorrência de *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis* nos cães trombocitopênicos e não trombocitopênicos.

Houve relação entre o grau de trombocitopenia observado e a infecção por *E. canis*. Valores de trombocitopenia severa (<50.000 plaquetas/mm^3 de sangue) pode ser considerado um indicador para a infecção de *E. canis* em cães.

A técnica de PCR mostrou-se superior ao exame parasitológico direto como método de diagnóstico, sendo um método seguro para detecção e identificação das principais infecções por hemoparasitos. A PCR apresentou grandes vantagens quando comparada à detecção direta dos parasitos em esfregaços sanguíneos e possibilitou a diferenciação a nível de espécie e/ ou subespécie do gênero *Babesia* e *Hepatozoon*. A única espécie e/ou subespécie de *Babesia* encontrada infectando cães de Goiânia foi a *B. c.vogeli*.

Cães coinfectados com dois ou mais hemoparasitos possuem uma probabilidade maior de apresentarem trombocitopenia. A detecção do DNA de hemoparasitos em cães não trombocitopênicos sugere a necessidade de pesquisa do hemoparasito em animais com sintomatologia clínica da doença, mesmo na ausência de alterações hematológicas típicas de hemoparasitoses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACCETTA, E.M.T. ***Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães (*canis familiaris, linnaeus*, 1758) trombocitopênicos da região dos lagos do Rio de Janeiro.** 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

3. ALMOSNY, N.R.P. ***Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 202f. Tese (Doutorado em medicina veterinária) –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica,1998.

4. ALMOSNY, N.R.P; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais e como zoonose. *In:* ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 1 ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros Ltda., 2002. p. 14-56.

5. ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciên Animal Bras**. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

6. ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: An ultrastructural study of experimental an natural infections. **Vet. Pathol.***,* v. 40, n. 2, p.149-156. 2003.

7. AUSTERMAN, J. W. Haemobartonellosis in a nonsplenectomized dog. **Vet Med Small Anim Clin**, v. 74, p. 954, 1979.

8. BANETH, G;WEGLER, B; Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Int. Med**., v.11, p.365-370, 1997.

9. BANETH, G.; MATHEW, J.S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D.K.; BARTA, J.R.; EWING, S.A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends Parasitol.**, Estados Unidos*,* v. 19, n. 1, p. 27-31, 2003.

10. BARKER, E.N.; TASKER, S.; DAY, M.J.; WARMAN, S.M.; WOOLLEY, K.; BIRTLES, R.; GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; NEWAJ-FYZUL, A.; CAMPBELL, M.D.; SPARAGANO, O.A.; CLEAVELAND, S.; HELPS, C.R. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and *"Candidatus Mycoplasma haematoparvum"* in dogs. **Vet. Microbiol.**, 140, p. 167–170, 2010.

11. BASHIRUDDIN, J.B; CAMMÀ, C; REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Vet. Parasit.**, 84, p.75–83, 1999.

12. BECK, R.; VOJTA, L.; MRLJAK, V.; MARINCULIĆ, A.; BECK, A.; ZIVICNJAK, T.; CACCIÒ, S.M. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. **Int. J. Parasitol.** v. 39, p.843–848, 2009.

13. BICALHO, K. A.; PASSOS, L.M.F; RIBEIRO, M.F.B. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec**. v. 54, n. 5, p. 546-548. doi: 10.1590/S0102-09352002000500016. 2002.

14. BIONDO, A.W.; DOS SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; VIEIRA, R.F.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**. v.18, n.3, p.1-7, 2009.

15. BIRKENHEUER AJ, NEEL J, RUSLANDER D, LEVY, MG, BREITSCHWERDT EB. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. **Vet Parasitol**, 124, p.151-160, 2004.

16. BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec***.,* v.61, n.3, p.566-571, 2009.

17. BRACCINI, G.L., CHAPLIN, E.L., STOBBE, N.S., ARAUJO, F.A.P., SANTOS, N.R.Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da faculdade de veterinaria da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, nos anos 1986 a 1990. **Arq. Fac. Vet.** UFRGS 20, p.134–149, 1992.

18. BRISON, J. J; MESSICK, J. B. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **J Am Vet Med Assoc,** v. 218, p. 1943–1945, 2001.

19. BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO, J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E.The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. **Vet. Res.,** v. 35, p. 141-146, 2004.

20. 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 BJID,** v. 8(3), p.259-262, 2004.

21. CAMACHO AT; PALLAS E, GESTAL JJ.; GUITIÁN FJ, OLMEDA AS, GOETHERT HK, TELFORD SR. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **Vet Rec** *3*, p.552-555, 2001.

22. CARDOSO, L; TUNA, J; VIEIRA, L; YISASCHAR-MEKUZAS, Y; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal**. Vet J.** v.183, p.232–233. 2008. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.10.009

23. CARDOZO, G.P.; OLIVEIRA, L.P.; ZISSOU, V.G.; DONINI, I.A.N.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M. analysis of the 16s rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. **Braz. J. of Microbiology**, v. 38, p. 478-479, 2007.

24. CARLOS, R. S. et al. Frequência de anticorpos anti-*Erhlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Parasit. Vet.**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

25. CARR, D. T.; ESSEX H. E. Bartonellosis: a cause of severe anaemia in splenectomised dogs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 57, p. 44-45, 1944.

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

27. CESAR,M.F.G. **Ocorrência de *E. canis* em cães sintomáticos atendidos no hospital veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição**. 2008. 57p. Dissertação (Mestrado em saúde Animal)- Universidade de Brasília, Brasília.

28. CHALKER, V.J. Canine *mycoplasmas*. **Research in Vet. Science**, n. 79, p. 1–8, 2005.

29. CHRISTOPHERS, S.R. The sexual life of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Scient. Mem. Off. Med. Sanit. Depart. Gov. India***,* v.28, p.1-14, 1907.

30. CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 843 p.

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

32. COSTA JUNIOR, L.M. **Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais: utilização de métodos de diagnóstico direto, indireto e molecular**. 2007. Tese (Doutorado em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 109p.

33. COSTA, L.M.J.R ; REMBECK, K.; RIBEIRO, M.F.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Vet J**., v.174(3), p. 673-676, 2007.

34. CRIADO-FORNELIO, A;GÓNZALEZ-DEL-RÍO, M.A.; A. BULING-SARAÑA; BARBA-CARRETERO, J.C. The “expanding universe” of piroplasms. **Vet. Parasit.** 119, p.337–345, 2004.

35. DA SILVA, J. N.; DE ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E.V.B.; DE FREITAS, A.G.; DO SANTOS, L.G.F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 108-111, abr.-jun. 2010. doi:10.4322/rbpv.01902008.

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

37. DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Vet. Parasit.**, Estados Unidos, v. 117, p. 285-290, 2003.

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

39. DANTAS-TORRES, F. Review canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.1, n.25, p.1-17, 2008. Doi:10.1186/1756-3305-1-25

40. DE MORAIS, H. S. A. et al. *Mycoplasma haemocanis* (previously *Haemobartonella canis*) in non-splenectomized dogs in Brazil: 4 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 421, 2003.

41. DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algére d´une Rickettsia du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.,** v. 28, p. 408-409, 1935.

42. DUARTE S.C.; LINHARES, G. F. C.; ROMANOWSKY, T. N.; DA SILVEIRA NETO O. J.; BORGES, L. M. F. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among Babesia *canis canis, Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Vet. Parasit.**, v. 152, p.16–20, 2008.

43. DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. S. E. Microbiol.**, California, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

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

45. EWING, S.A; DUBOIS, J.G; MATHEW, J.S; PANCIERA, R.J; Larval gulf coast ticks (Amblyomma maculatum) [Acari: Ixodidade] as host for Hepatozoon americanum [Apicomplexa: Adelorina]. **Vet. Parasitol**., v.103, p. 43-51, 2002.

46. FERNANDES, P. V. B; JERICÓ, M. M; LOPES, P. A; MOREIRA, M. A. B.; SULTANUM, C. A. R; ZORZI, V. B; MACHADO, F. L. A;CANTAGALLO, K. L. **Alterações hematológicas e bioquímicas em cães soropositivos para *ehrlichia canis* no período de 2002 a 2008.** Anais do 35º congresso brasileiro de medicina veterinária 19 a 22 de outubro de 2008, gramado-rs.

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

48. FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; AZEVEDO, R.R.M.; RODRIGUES, I.L.F.; ALMOSNY, N.R.P.Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães pcr-positivos para *Anaplasma platys* testados em elisa comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum.* **Rev. Bras. Parasitol. Vet.,** n.17, Supl.1, p. 5-8, 2008.

49. FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. **Patol. Clín. Vet.** Belo Horizonte: Rabelo, 1981, 293p.

50. FOLDVARI, G.; HELL, E; FARKAS,R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Vet. Parasit.**, 127, p.221–226, 2005.

51. FORLANO, M.D; TEIXEIRA, K.R.S; SCOFIELD, A.; ELISEI, C; YOTOKO, K.S.C; FERNANDES, K.R; LINHARES, G.F.C; EWING, S.A; MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Vet. Parasit.** ,n.145 , p. 21–30, 2007.

52. FRITZ D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). **Parasitol Res.** 106 (6), p.1339-42, 2010.

53. GARCIA DE SÁ A.; CERQUEIRA A.M.F.; O'DWYER, L.H.; ABREU F.S.; FERREIRA R.F.; PEREIRA A.M.; VELHO P.B.; RUBINI A.S.; ALMOSNY N.R.P. Detection of *Hepatozoon* spp in Naturally Infected Brazilian Dogs by Polymerase Chain Reaction. **Int. J. A. R. Vet. Medicine.** 5: 49-51, 2007.

54. GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat.** 3 Ed., St. Louis, Elsevier, 1387 p., 2006.

55. GROVES, M. G.; YAP, L. F. *Babesia gibsoni* in a dog. **J. A. Vet. Medical Association**, v. 153, n. 6, p. 689-694, September 1968.

56. HARRUS, S., WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. **The Vet. J.** (2010), doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001.

57. HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.,** v. 137, p. 182-188, 1978.

58. HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J.; ORELLANA, N.G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 211-216, 2005.

59. INOKUMA, H; MASARU OKUDA, M; OHNO, K; SHIMODA, K; ONISHI,T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasit**., 106, p.265–271, 2002.

60. INOKUMA, H; YOSHIZAKI,Y; MATSUMOTO, K; OKUDA, M; ONISHI, T; NAKAGOME, K; KOSUGI, R; HIRAKAWA, M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. **Vet. Parasit.**, n.121, p. 341–346, 2004.

61. IRWIN, P.J.; HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs. **Aust. Vet. J.,** v. 68, p. 204-209, 1991.

62. JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

63. JAMES, S.P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Govt. India New Ser.,** v. 14, p. 1-12, 1905.

64. JÚNIOR, O. A. M; MIRANDA, F. J. B; ALMEIDA, J; ALBERNAZ, A. P; MACHADO, J. A. Hepatozoonose canina em Campos dos Goytacazes, RJ. A**rq.** C**iênc. Vet.** Z**ool. Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 73-75, jan./jun. 2008.

65. KJEMTRUP AM, CONRAD PA. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature**. Vet Parasitol***, 138*, p.112-117, 2006.

66. KEMMING, G; MESSICK, J.B; MUELLER, W.; ENDERS, G; MEISNER,F; MUENZING,S;KISCH-WEDEL, H;SCHROPP, A; WOJTCZYK, C; PACKERT, K; MESSMER, K; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* infection--a kennel disease? **Comp Med**, v. 54, n. 4, p. 404-409, 2004.

67. KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of Two Distinct Hemotropic *Mycoplasmas* in French Dogs. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5397–5399, 2004.

68. KIKUTH, W. A new cause of anaemia, Bartonella canis nov. sp. **Klin. Wochnschr.,** v.7, p. 1729, 1928.

69. KUTTLER L.K. 1988. World-wide impact of babesiosis, p. 1-22. In: Ristic M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. CRC Press, New York.

70. LABARTHE, N.; PEREIRA, M.C.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A. E HOSKINS,J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis* and

Borrelia burgdoferi infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p. 67-75, 2003.

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

72. LABRUNA, M.B; MCBRIDE, J.W; CAMARGO, L.M; 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. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p.189-195, 2007.

73. LOULY, C. C. B. ; FONSECA, I. N. ; OLIVEIRA, V. F. ; LINHARES, G. F. C. ; MENEZES, L B ; BORGES, L. M. F. . Seasonal Dynamics of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) on dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. **Ciên.Rural**, v. 37, p. 464-469, 2007.

74. McDADE J. E. Ehrlichiosis a disease of animals and humans. **J. Infect. Dis**. Chiago, n.161, p.609-617, 1990.

75. MACIEIRA, D.B. **Avaliação da ocorrência de *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935) em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) com trombocitopenia na região metropolitana do Rio de Janeiro**. 2003. 89f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Clínica Veterinária)- Universidade Federal Fluminense, Niterói.

76. MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of Eh*rlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin.Pathol**, v.34, n.1, p. 44-8, 2005.

77. MARTIN, C.L.; STILES, J. Ocular infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia : Saunders, c.28, p.658-671, 1998.

78. MARTIN, A. R., BROWN G. K. , DUNSTAN R. H., ROBERTS T. K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Exp. Parasit.,** v. 109 p. 176–180, 2005.

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

80. MENDONÇA, C.S; MUNDIM, A.V; COSTA, A.S ; MORO, T.V. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosci. J.,** Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 167-174, Jan./April 2005.

81. MESSICK, J.B.; Walker, P.G.; Raphael, W.; Berent, L.M.; Shi, X. '*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis'* sp. nov., *'Candidatus Mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., *haemotrophic* parasites from a naturally infected opossum (Didelphis virginiana), alpaca (Lama pacos) and dog (Canis familiaris): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** n.52, p. 693–698, 2002.

82. MESSICK, J.B. Hemotrophic *mycoplasmas* (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 33, p. 2-13, 2004.

83. MOREIRA, S.M; BASTOS, C.V; ARAÚJO, R.B; SANTOS, M; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998–2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.55, p.141-147, 2003.

84. MUNDIM, A.V; DE MORAIS, I.A; TAVARES, M; CURY, M.C; SANTOS MUNDIM, M.J. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol**., v.153, p.3-8, 2008.

85. MURATA, T.; INOUE, M.; TATEYAMA, S.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **J. Vet. Medical Sciences**, Japão, v. 55, p. 867-868, 1993.

86. MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BANETH, G.; POLIZOPOULOU, Z.; FYTIANOU, A. Mixed *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and presuntive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. **Vet. Clin. Pathol.**, Estados Unidos, v. 33, n. 4, p. 249-251, 2004.

87. NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

88. NELSON, R.W.; G. COUTO. **Medicina interna de pequenos animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.1053p.

89. NELSON, R.W; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3ed. São Paulo: Elsevier, 2006.

90. NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, F.; CECI, C.; PENNISI, M.G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Vet. Microbiol.,** 142, p. 276–284, 2010.

91. O'DWYER, L. H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C. L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis*, em um

cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 83-84, 1997.

92. O'DWYER, L. H. **Diagnóstico de hemoparasitoses e carrapatos de cães procedentes de áreas rurais em três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2000. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 114p.

93. O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. **Clín. Vet.**, São Paulo, n. 31, p. 34-40, 2001.

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

95. O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro**: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 135 p., 2002.

96. ORIÁ, A.P.; PEREIRA, P.M.; LAUS, J.L. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis.* **Cienc. Rural**, v.34, p.1289-1295, 2004.

97. PASSOS LMF, GEIGER SM, RIBEIRO MFB, PFISTER K, ZAHLER-RINDER M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet Parasitol**, 127, p.81–85, 2005.

98. PATTON, W.S. Preliminary report on a new piroplasm (*Piroplasma gibsoni*. sp. nov.) found in the blood of the hounds of the madras Hunt and subsequently discovered in the blood of the jackal .Canis aureus. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 3, p. 274.281,1910.

99. 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.** n.1078, p.110-117, 2006.

100. PIANA, G.P.; GALLI-VALERIO, B. Su di un infezione del cane com parasiti endoglobulari. **Il Moderno Zooiatro**., v. 6, p. 163-169, 1895.

101. PRYOR, W. H. Jr; BRADBURY, R. P. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. **Lab Anim Sci**, v. 25, p. 566-569, 1975.

102. REBAR, A.H; MACWILLIAMS, P.S; FELDMAN, B.F; METZGER, F.L; POLLOCK, R.V.H; ROCHE, J. **Guia de hematologia para cães e gatos**. 1 ed., São Paulo: Roca, p. 133-156, 2003.

103. RUBINI, A.S; PADUAN K.S.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B.; O'DWYER, L.H. Acquisition and transmission of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol**., 164, p.324–327, 2009.

104. SALES, K.G; BRAGA, F.R.R; SILVA, A.C.F; MURARO, L.S; SIQUEIRA, K.B. Estudo retrospectivo (2006) da erlichiose canina no Laboratório do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá. **Acta Scient. Vet.**, v.35, p.555-557, 2007.

105. SALGADO, F.P. **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do centro de controle de zoonoses de Campo Grande Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 55p.

106. SANTOS, A. P**. Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre, 2008. 162 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

107. SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern Cattle fever. Washington, DC : Bureau of animal Industry, U.S. Departmente of Agriculture, **(Bulletin, n.1),** 1893.

108. SYKES, J.E.; BAILIFF, N.L.; BALL, L.M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M.M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. **J Vet Int Med**, v. 17, p. 423, 2003.

109. TASKER, S.; BINNS, S.H.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A.; HELPS, C.R.; JENSEN, W.A.; OLVER, C.S.; LAPPIN, M.R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum' in cats in the United Kingdon. **Vet Rec**, v. 152, p. 193-198, 2003. doi:10.1136/vr.152.7.193

110. THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 181, 2007.

111. TRAPP SM, DAGNONE AS, VIDOTTO O, FREIRE RL, AMUDE AM, MORAIS HS: Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet Parasitol**., v.140, p.223-230, 2006a.

112. TRAPP, S.M.; MESSICK, J.B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F.S.; MORAIS, H.S. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol**., v 141, p. 177-80, 2006b.

113. UENO, T.E.H; AGUIAR, D.M; PACHECO, R.C; RICHTZENHAIN,L.J; RIBEIRO, M.G; PAES, A.C; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**., Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, jul.-set. 2009.

114. WANER, T.; BANETH, G.; ZUCKERMAN, A. et al. *Hepatozoon canis* size measurement of gametocyte using image analysis technology. **Comp. Haematol. Int.**, v. 4, p.177-179, 1994.

115. WANER T., HARRUS S., BARK H., BOGIN E., AVIDAR Y., KEYSARY A., Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected Beagle dogs. **Vet. Parasitol.,** 69, p. 307–317, 1997.

116. WELZL, C.; LEISEWITZ, A. L.; JACOBSON, L. S.; VAUGHAN-SCOTT, T.; MYBURGH E. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. **J. South African Vet. Association**, Petroria, v. 72, n. 3, p. 158-162, September 2001.

117. WEST, H.J. Haemobartonellosis in the dog. **J Small Anim Pract**, v. 20, p. 543-549, 1979.

118. YABSLEY, M.J; MCKIBBEN, J; MACPHERSON, C.N. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia canis vogeli, Hepatozoon canis, Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Vet Parasitol.**, v.151, p. 279-285, 2008.

119. ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H., GOTHE, R. Detection of a new phatogenic *Babesia microti-like* species in dogs. **Vet.Parasit**., v. 89, p. 241-248. 2000.