

AÉCIO CARLOS DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO DAS HEMOPARASITOSEs CANINAS POR BIOLOGIA
MOLECULAR, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E CENTRIFUGAÇÃO
POR GRADIENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48d
2015
Oliveira, Aécio Carlos de, 1975-
Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia
molecular, alterações hematológicas e centrifugação por
gradiente / Aécio Carlos de Oliveira. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.40-51.

1. Cão - Doenças. 2. Hematologia veterinária.
3. Trombocitopenia. 4. Diagnóstico de laboratório.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.7089607572

AÉCIO CARLOS DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO DAS HEMOPARASIToses CANINAS POR BIOLOGIA
MOLECULAR, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E CENTRIFUGAÇÃO
POR GRADIENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2015.

Rosângela Zacarias Machado

Rodrigo Siqueira Batista

Camilo Amaro de Carvalho

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Coorientador)

Lissandro Gonçalves Conceição
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo de bom que tem me proporcionado.

Ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV), Viçosa, Minas Gerais, por me adotar como membro da família.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Ao Lissandro, por acreditar na minha capacidade e investir em minhas ideias.

A todos os professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram nesta empreitada.

À Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde aprendi muito, fiz grandes amigos e de onde tenho enorme saudade.

Aos colegas de laboratório, Lucinda e Luís Márcio, Aloísio e Toninho, pela ajuda e compreensão.

Aos residentes, servidores, professores e estagiários da clínica e cirurgia de pequenos animais que me ajudaram na seleção dos animais e coleta das amostras, sempre com disposição e boa vontade.

À Rosi, pela enorme competência em resolver problemas burocráticos, pela paciência e pelo carinho dedicado.

À Mariana Drumond, pela grande ajuda no experimento.

Aos colegas de pós-graduação, pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências pessoais.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) e do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), pela disposição em ajudar.

Ao Mafra, pelo apoio, pela confiança e pela atenção.

Ao Rafael, pela generosidade.

À Elisângela, por ter sido pai e mãe nas minhas ausências, minha eterna gratidão.

Aos meus dois príncipes, João Pedro e Davi, que fazem tudo valer a pena.

Aos meus pais, Marlei e Maria das Graças, por me darem a chance de obter o maior patrimônio que alguém pode possuir: o conhecimento.

Aos meus irmãos, Vanda, Cláudio e Eduardo, pelo incentivo.

Ao Francisco, por me receber com alegria todos os dias.

Ao Nelson, pela oportunidade da vivência em laboratório, que tanto me ajudou nesta caminhada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

AÉCIO CARLOS DE OLIVEIRA, filho de Manoel Marlei de Oliveira e Maria das Graças de Oliveira, nasceu em 4 de janeiro de 1975, em Ervália, Estado de Minas Gerais.

Em outubro de 1998, graduou-se em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em dezembro de 2009, obteve o título de *Magister Scientiae* em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2012, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, em nível de doutorado, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2015.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Trombocitopenias.....	3
2.2 Biologia molecular.....	3
2.3 <i>Babesia</i> spp.....	4
2.4 <i>Rangelia vitalii</i>	5
2.5 <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp.....	6
2.6 <i>Hepatozoon</i> sp.....	8
2.7 Sensibilidade das técnicas de diagnóstico laboratorial.....	10
2.8 Centrifugação por gradiente de densidade.....	12
CAPÍTULO 1 – DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS HEMOPARASITOSE EM CÃES TROMBOCITOPÊNICOS.....	13
1. Introdução.....	13
2. Metodologia.....	13
2.1 Amostras.....	13
2.2 Local de processamento das amostras.....	13
2.3 Extração de DNA.....	13
2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
2.5 Aspectos éticos.....	16
3. Resultados.....	16
4. Discussão.....	17
5 Conclusões.....	21
CAPÍTULO 2 – ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS RELACIONADAS ÀS HEMOPARASITOSE CANINAS.....	22
1. Introdução.....	22
2. Metodologia.....	22
2.1 Amostras.....	22
2.2 Local de processamento das amostras.....	22
2.3 Hematologia.....	22

2.4 Extração de DNA e PCR (reação em cadeia da polimerase)	23
2.5 Análises estatísticas	23
2.6 Aspectos éticos.....	24
3. Resultados	24
4. Discussão	28
5 Conclusões	30
CAPÍTULO 3 – CENTRIFUGAÇÃO POR GRADIENTE DE DENSIDADE NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATOZOONOSE E ERLIQUIOSE CANINA ...	31
1. Introdução	31
2 Metodologia.....	31
2.1 Amostras	31
2.2 Local de coleta das amostras.....	31
2.3 Esfregaço sanguíneo de sangue periférico (SP).....	32
2.4 Capa de leucócitos	32
2.5 Centrifugação por gradiente de densidade	32
2.6 Pesquisa de hematozoários.....	32
2.7 Extração de DNA	33
2.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
2.9 Análises estatísticas.....	33
2.10 Aspectos éticos.....	33
3 Resultados e discussão	34
4 Conclusões	38
3 Conclusões gerais.....	39
4 Referências bibliográficas.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Gamonte de <i>Hepatozoon canis</i> em célula sanguínea (seta), 1.000x.....	34
Figura 2 – Mórula de <i>Ehrlichia</i> em monócito (seta), 1.000x.....	35
Figura 3 – Mórulas de <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp. (setas curtas) e gamonte de <i>Hepatozoon canis</i> presentes em uma mesma célula (seta longa), 1000x.....	36
Figura 4 – Mórula de <i>Ehrlichia</i> spp. extracelular (seta). 1.000x.....	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Diagnóstico molecular (PCR) de hematozoários em amostras sanguíneas de cães trombocitopênicos (% ou N ^o absoluto)	16
Tabela 2 – Sequências de hematozoários selecionadas e depositadas no GenBank	17
Tabela 3 – Diagnóstico molecular (PCR) de hematozoários em amostras sanguíneas de cães trombocitopênicos (n = 100)	24
Tabela 4 – Índices hematológicos nos cães diagnosticados ou não com hematozoários (média ± erro-padrão da média)	25
Tabela 5 – Índices hematológicos nos cães com <i>Ehrlichia</i> spp. e sem hematozoários (média ± erro-padrão da média)	26
Tabela 6 – Média ± erro-padrão da média do volume corpuscular médio (fL), metamielócito e neutrófilo bastonete na interação <i>Ehrlichia</i> spp. – <i>Babesia</i> spp.	27
Tabela 7 – Resultados da ocorrência de <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Hepatozoon</i> sp. utilizando as técnicas da PCR, CGD, CL e SP em % ou número absoluto (N=100)	34
Tabela 8 – Nível de concordância, pelo teste de Kappa, entre as técnicas SP, CL e CGD com a PCR no diagnóstico de <i>Ehrlichia</i> spp.	37
Tabela 9 – Nível de concordância, pelo teste de Kappa, entre as técnicas SP, CL e CGD e a PCR no diagnóstico de <i>Hepatozoon</i> sp.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BAS	Basófilo
BAST	Neutrófilo bastonete
CID	Coagulação intravascular disseminada
CGD	Centrifugação por gradiente de densidade
CL	Capa de leucócitos
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMC	Erliquiose monocítica canina
EOS	Eosinófilo
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
HTM	Hematimetria
LG	Leucometria global
LIN	Linfócito
META	Metamielócito
MIEI	Mielócito
MON	Monócito
NEUT	Neutrófilo segmentado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCT	Plaquetócrito
PDW _c	Índice de anisocitose plaquetária
PLT	Plaquetas
PT	Proteína total plasmática
RDW	Índice de anisocitose eritrocitária
SP	Sangue periférico
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário médio
UFV	Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

OLIVEIRA, Aécio Carlos de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia molecular, alterações hematológicas e centrifugação por gradiente.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição. Coorientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Neste estudo foram analisadas 100 amostras de sangue de cães com trombocitopenia importante (plaquetas < 100.000/ μ L), oriundas da rotina laboratorial de atendimento do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Todas as amostras de sangue foram submetidas ao analisador hematológico automático, à confecção de esfregaços sanguíneos de sangue total, à capa de leucócitos e à técnica de centrifugação por gradiente de densidade. Além disto, as amostras foram submetidas à extração de DNA e posteriormente à reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico molecular de *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* sp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. e *Leishmania* spp. Os resultados da PCR confirmaram amostras positivas para *Ehrlichia* spp. (69%), *Hepatozoon* sp. (25%), *Babesia* spp. (16%) e *Anaplasma platys* (4%), com alguns animais apresentando até três patógenos em coinfeção. Verificou-se ainda estreita relação entre a ocorrência da trombocitopenia e erliquiose e a alta frequência de coinfeções. A centrifugação por gradiente de densidade mostrou-se bastante sensível na identificação do *Hepatozoon canis*, com resultados superiores aos das técnicas tradicionais (esfregaço sanguíneo e capa de leucócitos) e concordância substancial com a PCR. Foram observadas diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos entre os animais com e sem hematozoários, como a presença de desvio nuclear de neutrófilos à esquerda maior nos animais positivos para *Babesia* spp. e alterações no volume plaquetário médio e PDWc nos animais com erliquiose. No sequenciamento realizado, identificou-se a presença de várias espécies, incluindo *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis vogeli*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rangelia vitalii*, sendo os patógenos *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum* relacionados a infecções em humanos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Aécio Carlos de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2015. **Density gradient centrifugation, molecular biology and hematological changes in the diagnosis of canine hemoparasitoses.** Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

In this study we analyzed blood samples from 100 dogs with important thrombocytopenia (Platelets < 100.000/ μ L), of the routine care of the Veterinary Hospital from Universidade Federal de Viçosa (UFV). All Samples were processed on automated hematology analyzer and subjected to analysis of their blood smears, buffy coat, and the density gradient centrifugation technique. In addition, samples were subjected to procedure for DNA extraction and subsequent polymerase chain reaction (PCR) to *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* sp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. and *Leishmania* spp. The PCR results confirmed positive samples to *Ehrlichia* spp. (69%), *Hepatozoon* sp. (25%), *Babesia* spp. (16%) and *Anaplasma platys* (4%), with some animals having up to three concomitant pathogens. We also found a close relationship between the occurrence of thrombocytopenia and ehrlichiosis and the high frequency of coinfection. The density gradient centrifugation showed to be more sensitive at detecting *Hepatozoon canis* than traditional techniques (blood smears, buffy coat) and the results are in agreement to those by PCR. Significant differences were observed in blood parameters between animals with and without hemoparasite, such as presence of a nuclear deviation of neutrophils on the left bigger in positive animals for *Babesia* spp. and changes in mean platelet volume and PDWc in animals with ehrlichiosis. In the sequencing performed we identified the presence of several species, including *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis vogeli*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rangelia vitalii*, being the *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* related pathogens infections in humans.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As hemoparasitoses como anaplasmoses, babesioses, erliquioses e hepatozoonoses figuram entre as principais doenças que afetam os cães de todo o mundo, apresentando em comum carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* como principal vetor (HARRUS *et al.*, 1997, DUMLER *et al.*, 2001; O'DWYER, 2011). Na busca por métodos de diagnósticos para pesquisa desses agentes em substituição aos esfregaços sanguíneos, caracterizados pela baixa sensibilidade, o diagnóstico e a caracterização molecular têm demonstrado maior sensibilidade, contribuindo inclusive para a identificação de novas espécies e o entendimento dos processos de transmissão e disseminação desses agentes.

Como as técnicas moleculares ainda não são empregadas de forma rotineira no diagnóstico das hemoparasitoses em pequenos e médios laboratórios de análises clínicas, no Brasil, as chances de resultados falso-negativos decorrentes de exames microscópicos, com base em esfregaços sanguíneos, devem-se à baixa sensibilidade das técnicas empregadas. Assim, o desenvolvimento de técnicas rápidas, mais sensíveis e que não demandem mão de obra especializada e grandes investimentos em equipamentos podem atenuar esse problema. Neste sentido, a centrifugação por gradiente de densidade (CGD) que concentra células onde estão presentes patógenos como *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon canis* podem melhorar a sensibilidade da pesquisa de hematozoários.

Os hematozoários também são conhecidos por levarem a alterações hematológicas nas séries vermelha, branca e das plaquetas (BANETH; WEIGLER, 1997; DUMLER *et al.*, 2001; DANTAS-TORRES; FIGUEIREDO, 2006). Portanto, o conhecimento das alterações hematológicas específicas produzidas nos animais, por cada hematozoário, pode contribuir de forma significativa para o diagnóstico diferencial, quando não for possível a identificação do agente causador da enfermidade.

Considerando as informações citadas, este trabalho consistiu em três objetivos principais:

1 – testar a centrifugação por gradiente de densidade como técnica alternativa no diagnóstico diferencial de organismos dos gêneros *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* sp.;

1 relacionar a presença dos hematozoários com as alterações hematológicas verificadas nos cães em estudo; e

- 2 identificar por técnicas moleculares e caracterizar os principais hematozoários presentes nos animais sob estudo na microrregião de Viçosa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Trombocitopenias

As trombocitopenias são coagulopatias plaquetárias cujo número de plaquetas circulantes encontra-se diminuído, podendo ser aplásicas ou de consumo. As trombocitopenias aplásicas são decorrentes de hipoplasia megacariocítica (resultantes de lesões medulares causadas por drogas, infecções ou radiações) e metaplasia medular (quando há substituição dos megacariócitos por outras células, como nas leucemias, linfomas e mielofibrose). As trombocitopenias de consumo são causadas pelo consumo excessivo no local da afecção, por exemplo: doenças infecciosas hemorrágicas (peste suína e leptospirose), púrpura trombótica trombocitopênica, coagulação intravascular disseminada (CID) e trombocitopenias de origem imunológica, quando há destruição plaquetária por anticorpos (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Em cães, a erliquiose, a babesiose e a anaplasiose são doenças conhecidas como indutoras de trombocitopenias, sendo a erliquiose a principal delas (HARRUS, 1997; GUIMARÃES *et al.*, 2004 BAKER, 2007).

2.2 Biologia molecular

A revolução molecular começou quando Watson e Crick, em 1953, propuseram a estrutura de dupla-fita do DNA, vindo a seguir como fato marcante, em 1975, a purificação de enzimas de restrição por Nathans e Smith, que são ferramentas essenciais para o isolamento e a amplificação de fragmentos específicos de DNA e para a clonagem *in vivo*, tecnologia desenvolvida a partir das técnicas de DNA recombinante, descritas anteriormente por Berg, em 1972 (MOLINA; TOBO, 2004). Em 1987, Kary Mullis propôs a reação em cadeia da polimerase (PCR), marco principal no desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular. Desde então o desenvolvimento das técnicas de genética molecular tem revolucionado a prática da patologia, da anatomia e das análises clínicas, atuando principalmente no diagnóstico de doenças infecciosas, câncer, doenças genéticas, transplantes e patologia clínica (LINSCOTT, 2002; PASSOS-BUENO; MOREIRA, 2004). Esses estudos permitem utilizar diversas amostras biológicas, como sangue periférico, fluidos corporais, materiais obtidos por meio de punção, tecidos frescos e parafinizados. Na área de

doenças infecciosas, as técnicas moleculares são extremamente úteis na detecção de microrganismos de crescimento lento, ou daqueles não cultiváveis, sendo também empregadas na determinação de resistência antimicrobiana, no monitoramento de doenças por meio da quantificação dos agentes envolvidos na infecção e em estudos epidemiológicos (LINSCOTT, 2002).

Na Medicina Veterinária, as técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso no diagnóstico de diversos patógenos, por exemplo: *Ehrlichia* (DAGNONE et al., 2003), *Anaplasma* (BROWN et al., 2001), *Babesia* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) e *Hepatozoon* (MATHEW et al., 2000).

2.3 Babesia spp.

A babesiose canina é causada pelo protozoário *Babesia*, que compreende duas espécies: a *B. gibsoni* e *B. canis* (LOBETTI, 1998), sendo esta última, subdividida em três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* (CARRET et al., 1999). No Brasil, a espécie mais comumente observada é a *B. canis vogeli* (PASSOS et al., 2005), com relatos também de *B. canis rossi* (VASCONCELOS, 2010) e *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006). Conhecidos como carrapatos vetores de *B. gibsoni* e *B. canis vogeli*, os carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* estão presentes em todo o Brasil, especialmente em áreas urbanas (SZABÓ et al., 2007). Apesar de o exame microscópico direto ser o método convencional para detecção de *Babesia* spp. em amostras de sangue de animais enfermos, sendo um método de diagnóstico conclusivo de fácil execução e de baixo custo, ele não é apropriado para a diferenciação de espécies ou subespécies de *Babesia* (CACCIO et al., 2002).

Na babesiose, as subespécies de *B. canis* apresentam diferentes níveis de patogenicidade. A *B. c. rossi*, transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi*, é considerada de elevada patogenicidade; a *B. c. vogeli*, transmitida por carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus*, é considerada de moderada patogenicidade; e a *B. c. canis*, transmitida pelo *Dermacentor reticulatus*, é considerada de baixa patogenicidade (UILENBERG et al., 1989). Predominantemente, constata-se que animais infectados por *B. canis vogeli* apresentam anemia regenerativa (CARLI et al., 2009) e diminuição do volume globular (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006), com a ocorrência de trombocitopenia sendo descrita por vários autores, embora sua causa ainda não esteja completamente elucidada (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; DANTAS-TORRES;

FIGUEREDO, 2006). Têm-se como mecanismos mais prováveis deste achado a destruição mediada por anticorpos e o consumo acelerado de plaquetas em decorrência de vasculite endotelial ou sequestro esplênico (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). Anemia normocítica, normocrômica, policromasia, anisocitose, leucocitose por neutrofilia, monocitose, linfopenia e trombocitopenia foram relatadas nessa enfermidade por Guimarães *et al.* (2004).

Nos últimos anos, as técnicas moleculares, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise das sequências, têm representado métodos precisos de identificação das espécies, utilizados para o diagnóstico individual e para estudos epidemiológicos das babesioses em cães (ZÄHLER *et al.*, 2000a,b; CACCIO *et al.*, 2002; INOKUMA *et al.*, 2003). Abordagens recentes no campo da biologia molecular têm aumentado a utilização de técnicas moleculares, tornando essas ferramentas apropriadas para estudos taxonômicos e caracterização filogenética (UILENBERG, 2006), o que tem resultado em novas descobertas e no surgimento de novos grupos, com diversas sugestões para alterações taxonômicas (KJEMTRUP; CONRAD, 2006; HUNFELD *et al.*, 2008).

2.4 *Rangelia vitalii*

Em 1908, uma nova doença canina foi relatada no Brasil com o nome de “nambiuvú”, uma palavra indígena que em guarany significa “orelhas sangrentas”. Mais tarde essa doença foi relacionada a um novo piroplasma, chamado *Piroplasma vitalii* (PESTANA, 1910). As semelhanças na morfologia intraeritrocítica com a *B. canis* e com os sinais clínicos laboratoriais da babesiose fundamentaram sua classificação taxonômica inicial. No entanto, por sua capacidade de parasitar macrófagos e células endoteliais, esse parasito foi classificado em um novo gênero, *Rangelia vitalii* (CARINI; MACIEL, 1914; LORETTI; BARROS, 2005). Após várias discussões quanto à real posição taxonômica desse parasito, *R. vitalii* foi descrito como sinônimo de *B. canis* em diversos livros do final do século (LEVINE, 1973; PEIRCE, 2000), o que atualmente, com base em evidências moleculares, tem sido questionado, evidenciando as diferenças entre esses dois gêneros (EIRAS *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2014).

2.5 *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

Inicialmente classificados de acordo com a célula parasitada – granulócito, linfócito, monócito e plaqueta, os organismos do gênero *Ehrlichia* são atualmente agrupados de acordo com suas características moleculares (principalmente para os genes rRNA 16S e groESL), suas propriedades antigênicas, sua ecologia, sua distribuição geográfica e sua patogenicidade. Assim, Dumler *et al.* (2001) propuseram que: i) o gênero *Anaplasma* fosse expandido para incluir *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys*, sendo o *Anaplasma phagocytophila* considerado sinônimo de *Ehrlichia equi* e do agente da erliquiose granulocítica humana; ii) a espécie *Cowdria ruminantium* fosse colocada no gênero *Ehrlichia* como *Ehrlichia ruminantium*, juntamente com as espécies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* e *Ehrlichia muris*; iii) o gênero *Neorickettsia* fosse expandido para incluir as espécies *Ehrlichia risticii* e *Ehrlichia sennetsu*; e iv) a espécie *Wolbachia pipientis* se tornasse membro único do gênero *Wolbachia*.

A *Ehrlichia* é uma bactéria Gram negativa, de vida intracelular obrigatória, pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmatacea (DUMLER *et al.*, 2001). Diagnosticada pela primeira vez por Donatien e Lestoquard em 1935, seu principal vetor é o carrapato *R. sanguineus* (GROVES *et al.*, 1975). A primeira descrição de *Ehrlichia* em cães foi feita em 1935 por Donatien e Letosquard, na Argélia. No Brasil, o primeiro relato em cão foi feito na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA *et al.*, 1973).

Clinicamente, as erliquioses caninas figuram dentre as mais graves doenças infecciosas que acometem os cães, principalmente quando causadas por *E. canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC) (DUMLER *et al.*, 2001). Experimentalmente, os animais inoculados com *E. canis* caracterizam-se por apresentar febre, esplenomegalia, linfadenomegalia, perda de peso, anorexia e prostração (HASEGAWA, 2005). Com período de incubação que varia de 8 a 20 dias, a erliquiose monocítica canina é uma doença caracterizada por três fases distintas: aguda, assintomática ou subclínica e crônica. Na fase aguda observam-se manifestações clínicas inespecíficas nos cães, com estes normalmente se recuperando de forma espontânea, entrando numa fase assintomática ou subclínica, podendo permanecer infectados por longos períodos. Nessa fase os animais imunocompetentes podem eliminar o parasita ou, em alguns casos, desenvolver a fase crônica da doença,

caracterizada por supressão medular com pancitopenia, sangramentos das mucosas e conjuntivas e alta letalidade (HARRUS *et al.*, 1997; NEER, 1998). Dentre os resultados laboratoriais mais comuns na erliquiose canina, tem-se a anemia não regenerativa, normocítica e normocrômica, acompanhada de leucopenia e trombocitopenia (GARCIA-NAVARRO, 2005). Em estudo realizado com cães, relacionando-se o resultado positivo da PCR para o diagnóstico de *E. canis* com a determinação de trombocitopenia quando da avaliação laboratorial, Neer e Harrus (2006) observaram trombocitopenia e anemia em 82% das amostras analisadas, sendo a ocorrência de trombocitopenia reportada em todos os estágios da doença, com anemia geralmente do tipo arregenerativa. Também é relatada a queda no número de plaquetas a partir da segunda semana pós-infecção, permanecendo baixa por toda fase aguda e crônica da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004).

Em 1987, Maeda e colaboradores relacionaram a *Ehrlichia chaffeensis* a um caso de erliquiose humana, demonstrando seu caráter/potencial zoonótico. Nos anos seguintes, outros casos de erliquiose humana por *E. chaffeensis* e *E. canis* foram relatados em diversos locais do mundo (SEXTON *et al.*, 1998; PATEL; BIRD, 1999; PEREZ *et al.*, 2005), demonstrando sua grande dispersão (não há ainda comprovação definitiva de infecção por *E. canis*), o que fez com que o assunto despertasse maior interesse entre os pesquisadores e as autoridades de saúde.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada com sucesso para a amplificação de genes específicos do DNA de *E. canis* no sangue de cães infectados, o que permite sua evidenciação durante a fase aguda de infecção mesmo que essa bactéria exista em quantidades ínfimas na amostra biológica de estudo (DAVOUST *et al.*, 1999). Técnicas para o diagnóstico molecular podem ser utilizadas na detecção de DNA de *E. canis* tanto em amostras sanguíneas quanto em outros tecidos, como pulmão e baço, permitindo ainda o diagnóstico de erliquiose sobre um fragmento de tecido fresco ou congelado (DAVOUST *et al.*, 1999). No início dos anos 2000, foram desenvolvidas novas estratégias de PCR além da PCR simples ou convencional, quais sejam a *nested*-PCR e a PCR em tempo real, as quais permitiram melhorar a sensibilidade dessa técnica (MATHEW *et al.*, 2000). Quanto à precocidade da detecção, Wen *et al.* (1997) constataram que a *nested*-PCR possibilita a detecção de DNA de *E. canis* na capa de leucócitos de cães infectados experimentalmente logo aos quatro dias pós-infecção. Diversos pesquisadores identificaram, com sucesso, cães natural e experimentalmente infectados com *E. canis* pela PCR, *nested*-PCR e PCR em tempo real (MACIEIRA *et*

al., 2005; DINIZ *et al.*, 2007; LABRUNA *et al.*, 2007; DAGNONE *et al.*, 2009; FARIA *et al.*, 2010; NAKAGHI *et al.*, 2010). Vale registrar a primeira caracterização molecular de uma cepa brasileira de *E. canis* realizada por Aguiar *et al.* (2008), utilizando os genes *dsb*, 16S rDNA e *p28*.

Na detecção do *A. platys*, a PCR é considerada a técnica de maior sensibilidade no diagnóstico da doença, auxiliando na classificação taxonômica desse agente infeccioso e na identificação de gêneros e espécies de carrapatos que podem servir de vetores para a doença, permitindo ainda a distinção entre os pacientes que permaneceram com infecção e aqueles que foram tratados com sucesso (PERSING, 1996; MASSUNG *et al.*, 1998; INOKUMA *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2005). Essa técnica auxilia ainda na detecção de novas cepas ou variantes de espécies, permitindo a detecção precoce de infecção, podendo ser utilizados sangue total ou frações celulares, tecidos frescos ou parafinados, medula óssea ou carrapatos como materiais biológicos para identificação desse organismo (PERSING, 1996; VINASACO *et al.*, 2007).

No diagnóstico do *A. phagocytophilum*, muitos testes da PCR convencional e em tempo real têm sido desenvolvidos para detecção de DNA no sangue periférico, na capa leucocitária, na medula óssea e nas amostras de tecido esplênico, tendo o 16S rRNA e o MSP2 como genes-alvo da maioria dos testes utilizados (SANTOS, 2011). Em cães experimentalmente infectados, os resultados da PCR em sangue total foram positivos entre seis e oito dias antes e três dias depois do aparecimento de mórulas no esfregaço sanguíneo (EGENVALL *et al.*, 1998; EGENVALL *et al.*, 2000b).

2.6 *Hepatozoon* sp.

Originalmente descrito na Índia, o gênero *Hepatozoon* foi inicialmente classificado como *Leucocytozoon canis* (BENTLEY, 1905a,b; JAMES, 1905). Wenyon (1910) sugeriu que o nome genérico *Leucocytozoon* fosse substituído por *Hepatozoon*, sendo a partir de então denominado *H. canis*, tendo o carrapato marrom, do grupo *Rhipicephalus sanguineus*, como hospedeiro invertebrado (CHRISTOPHERS, 1907). O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Hepatozoiidae, subordem Adeleorina (WENYON, 1926). Anos mais tarde o *Hepatozoon* foi separado em duas espécies distintas, *H. canis* e *H. americanum* (BANETH *et al.*, 2000; MATHEW *et al.*, 2000), sendo o *H. canis* transmitido pela ingestão do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (CHRISTOPHERS, 1907).

A hepatozoonose canina foi descrita pela primeira vez em solo brasileiro por Massard, em 1979, no Estado do Rio de Janeiro. Em nosso país, boa parte dos cães infectados apresenta infecção subclínica por *Hepatozoon canis*, encontrado com bastante frequência em associação simultânea com outros patógenos, como *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. (O'DWYER, 2011), com seus gamontes podendo ser observados em neutrófilos e monócitos (MAKIMURA; KINJO, 1991; MURATA *et al.*, 1993; BANETH; WEIGLER, 1997). Entre 28 e 43 dias após a infecção pode-se observar pela primeira vez a presença de gamontes de *H. canis* em células do sangue periférico (BANETH *et al.*, 1998), podendo constatar alta parasitemia associada à doença grave, caracterizada por anemia, febre, anorexia, perda de peso e corrimento ocular (BANETH; WEIGLER, 1997). Junto com a necropsia evidenciou-se a presença de esquizontes de *Hepatozoon* no baço, nos pulmões, no fígado, nos rins, no pâncreas, na medula óssea e na pleura (BANETH; WEIGLER, 1997). Anorexia, hipertermia, diarreia, alterações respiratórias, palidez de mucosa, apatia e prostração em animais com hepatozoonose, associada ou não a outras hemoparasitoses, também foram observadas (MUNDIM *et al.*, 2008). Murata *et al.* (1991) relataram a paralisia dos membros posteriores como principal sintoma, enquanto Vincent-Johnson (2003) verificou atrofia muscular e caquexia crônica em animais infectados por *H. americanum*. Os resultados hematológicos mais comuns nessa enfermidade são anemia não regenerativa e leucocitose com neutrofilia sem desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (BANETH; WEIGLER, 1997; EWING *et al.*, 2000; VINCENT-JOHNSON, 2003), com a contagem de plaquetas apresentando-se normal ou aumentada na maioria dos casos (VINCENT-JOHNSON, 2003). Ibrahim *et al.* (1989) verificaram que todos os neutrófilos parasitados são deficientes em mieloperoxidase, com esta deficiência provavelmente reduzindo a função fagocítica dos neutrófilos, o que pode tornar o animal altamente suscetível às infecções sistêmicas.

Os primeiros estudos moleculares sobre o *Hepatozoon* datam da década de 1990, em pesquisas realizadas com serpentes (WOZNIAK *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1999). Baneth *et al.* (2000), por meio de estudos genéticos e de propriedades antigênicas, reforçaram a separação do *Hepatozoon* em duas espécies diferentes: *H. canis* e *H. americanum*. Mathew *et al.* (2000) foram os primeiros a sequenciar o gene 18S rRNA das duas espécies de *Hepatozoon* que infectam cães: *H. americanum* e *H. canis*, com os resultados obtidos indicando uma estreita relação de grupo entre as duas espécies. Também em 2000, Baneth *et al.*, com base em diferenças genéticas e

antigênicas, confirmaram a separação desse gênero em duas espécies distintas. A PCR tem sido utilizada para o diagnóstico do *H. canis*, demonstrando alta sensibilidade (INOKUMA *et al.*, 2002; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; RUBINI *et al.*, 2005; PALUDO *et al.*, 2005; KARAGENC *et al.*, 2006; FORLANO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; LASTA *et al.*, 2009). No início dos anos de 2000, Paludo *et al.* (2005) e Rubini *et al.* (2005) realizaram a caracterização molecular do *Hepatozoon*, relacionando a espécie brasileira à japonesa de *H. canis* (INOKUMA *et al.*, 2002), sendo os *primers* sugeridos por Inokuma *et al.* (2002): HepF 5' – ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC – 3' e HepR 5' – CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG – 3', utilizados com sucesso por vários pesquisadores brasileiros (RUBINI *et al.*, 2005; FORLANO *et al.*, 2007; LASTA *et al.*, 2009).

2.7 Sensibilidade das técnicas de diagnóstico laboratorial

Geralmente a detecção da *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* sp. é baseada no diagnóstico direto por meio de esfregaços sanguíneos (O'DWYER *et al.*, 2001; AGUIAR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2006; CARLOS *et al.*, 2007). Por essa característica, estima-se que os dados a respeito da prevalência de ambos sejam subestimados devido à baixa sensibilidade (O'DWYER *et al.*, 2001; MYLONAKYS *et al.*, 2003) e especificidade no caso de *E. canis* (RIKIHISA *et al.*, 1994).

No caso do *H. canis*, há grande dificuldade de diagnóstico pela pesquisa dos gamontes em esfregaços sanguíneos, principalmente nas parasitemias baixas e intermitentes (BANETH *et al.*, 1998). Neutrófilos e monócitos podem ser parasitados e sofrer alterações morfológicas causadas pelo parasita, o que dificulta a identificação correta da célula (MURATA *et al.*, 1993). A PCR para *H. canis* tem sido utilizada nos últimos anos, demonstrando alta sensibilidade (INOKUMA *et al.*, 2002; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; KARAGENC *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2005; RUBINI *et al.*, 2005; FORLANO *et al.*, 2007; LASTA *et al.*, 2009), entretanto sua utilização, por causa da sensibilidade, ainda não foi incorporada à rotina laboratorial de pequenos e médios laboratórios de análises clínicas, estando presente de forma mais contundente em laboratórios com mais recursos financeiros e técnicos e nas instituições de pesquisa.

Na erliquiose, apesar de a detecção direta atualmente realizada por meio de esfregaços sanguíneos ser a técnica-padrão mais utilizada, em virtude de sua rapidez, ela

se mantém como técnica de baixa sensibilidade, visto o pequeno número de células com o parasita, considerando quadros comumente caracterizados por leucopenia e a dependência do microscopista, devido ao cansaço do observador, decorrente do número de esfregaços e células examinados (PADDOCK; CHILDS, 2003; PASSOS *et al.*, 2005). Neste sentido, diversos estudos têm produzido resultados variáveis quanto à sensibilidade de observação de mórulas em esfregaço sanguíneo, na capa de leucócitos e em aspirados e esfregaços de órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, com resultados variando bastante. Têm sido obtidos valores de detecção em esfregaço, quando da utilização da capa de leucócitos, desde 0% (SILVEIRA, 1992), 1% (SAINS-RODRIGUEZ, 1996), 4% (ELIAS, 1991) até extremos de 66% (MYLONAKIS *et al.*, 2003). Mylonakis *et al.* (2003), comparando os resultados do diagnóstico direto para *E. canis* a partir de diferentes tecidos, como sangue periférico (SP), aspirados de medula óssea (MO), linfonodo (LN) e capa de leucócitos (CL), concluíram que o diagnóstico a partir de SP é o que apresenta a menor sensibilidade (8%), quando comparado ao da MO (34%), do LN (60,9%) e da capa de leucócitos (66%), o que desencoraja a utilização dessa técnica para diagnóstico e demonstra a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas. Hernández (2010), em um estudo com 91 cães, encontrou 4% e 40% de positividade para pesquisa em esfregaços sanguíneos e PCR, respectivamente. Em outro estudo semelhante, Ramos *et al.* (2009) avaliaram 100 animais e constataram que nove apresentaram resultados positivos para *E. canis*, pela análise do esfregaço sanguíneo, e 57, pela utilização da *nested*-PCR, devendo ser ressaltado que dos nove casos positivos, quatro apresentaram resultados negativos quando a técnica da PCR convencional foi utilizada. Ueno *et al.* (2009), em experimento avaliando 70 cães com diagnóstico presuntivo de EMC, confirmaram que 40% das amostras analisadas apresentavam DNA compatível com o gênero *Ehrlichia*, e constataram que somente em 7,1% desses cães (cinco animais) foi possível a visualização de mórulas de *Ehrlichia* spp., com uma das amostras testadas apresentando resultados negativos com o uso da PCR convencional. Esses trabalhos, mostrando casos de positividade em esfregaços sanguíneos não confirmados pela técnica de PCR, demonstram que a experiência do profissional de laboratório é de suma importância para que resultados falso-positivos não sejam liberados em laudos laboratoriais.

2.8 Centrifugação por gradiente de densidade

A centrifugação por gradiente de densidade (CGD) tem sido utilizada em diversos procedimentos em que a separação ou purificação de algum tipo celular específico é necessária, como no cultivo de células-tronco (KAWASAKI-OYAMA *et al.*, 2008), na separação e concentração de mononucleares (ALVES *et al.*, 2009), nos trabalhos de reprodução com gametas (ALMEIDA; ALVAREZ, 2003) e na concentração de oocistos no diagnóstico de *Cryptosporidium* (LIMA & STAMFORD, 2003). Como as mórulas de *Ehrlichia* spp. e os gamontes de *Hepatozoon* sp. estão presentes em mononucleares, a concentração dessas células possivelmente aumentará as chances de se encontrar esses agentes patogênicos. Não foram encontrados trabalhos utilizando a CGD no diagnóstico de hemoparasitoses.

CAPÍTULO 1 - DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS HEMOPARASITOSE EM CÃES TROMBOCITOPÊNICOS

1. Introdução

Hemoparasitoses como anaplasmoze, babesiose, erliquiose e hepatozoonose figuram entre as principais doenças que afetam os cães em todo o mundo, apresentando em comum os carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* como principais vetores. Na busca por métodos de diagnósticos para pesquisa desses agentes, em substituição aos esfregaços sanguíneos caracterizados pela baixa sensibilidade, a utilização de técnicas com base na biologia molecular tem se destacado, contribuindo inclusive com a possibilidade de identificação de novas espécies e a melhor compreensão dos processos de transmissão e disseminação desses patógenos.

2. Metodologia

2.1 Amostras

Entre os meses de março de 2013 e janeiro de 2014 foram obtidas amostras de sangue total com EDTA de 100 cães (56 fêmeas e 44 machos) com trombocitopenia importante (plaquetas < 100.000/ μ L), de raças e idades variadas, oriundos da microrregião de Viçosa, Minas Gerais.

2.2 Local de processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária e no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos da Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Extração de DNA

A extração de DNA de sangue total foi realizada com kit¹, seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi identificado e armazenado a -20°C, até a realização das PCRs.

¹ Wizard Genomic DNA Purification – Promega Corporation.

2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do DNA de bactérias do gênero *Ehrlichia* foi realizada por PCR. Resumidamente, realizou-se a primeira reação com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) baseados na sequência parcial do gene 16S rDNA presente em todas as ehrlichias ECC (5'-GAA CGA ACG CTG GCG GCA AGC-3') e ECB (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3'), com desnaturação inicial a 94 °C, por 2 minutos, seguida por 40 ciclos com desnaturação a 94 °C, por 1 minuto, anelamento a 65 °C, por 1 minuto, extensão a 72 °C, por 1 minuto, e pela extensão final a 72 °C, por 5 minutos (DAWSON *et al.*, 1994). Em seguida, as amostras positivas para *Ehrlichia* spp. foram testadas para *E. canis* com os *primers* HE3 (5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT-3') e ECAN (5'-CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A-3'), com três ciclos a 94 °C, por 1 minuto, 55 °C, por 2 minutos, e 72 °C, por 90 segundos; 37 ciclos de 92 °C, por 1 minuto, 55 °C, por 2 minutos e 72 °C, por 90 segundos, seguidos por uma etapa de extensão final a 72 °C, por 7 minutos (MURPHY *et al.*, 1998). As amostras negativas para *Ehrlichia canis* foram testadas com os *primers* Dsb-330 (5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e Dsb-728 (CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3'), com base na sequência parcial do gene *dsb*, a 95 °C, por 2 minutos, 50 ciclos de 95 °C, por 15 segundos, 58 °C, por 30 segundos, 72 °C, por 30 segundos e 72 °C, por 5 minutos (DOYLE *et al.*, 2005).

A amplificação do DNA do protozoário do gênero *Hepatozoon* foi realizada com *primers* baseados na sequência parcial do gene 18S rDNA, presente em todos os hepatozoons, HepF (5'-ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC - 3') e HepR (5'-CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG - 3'), com desnaturação inicial a 94 °C, por 1 minuto, seguida de 35 ciclos contendo desnaturação a 94 °C, por 1 minuto, anelamento a 57 °C, por 1 minuto, extensão a 72 °C, por 1 minuto, e extensão final a 72 °C, por 5 minutos (INOKUMA *et al.*, 2002).

Para *Babesia* spp., as análises foram realizadas utilizando os *primers* Piro A (5'-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G-3') e Piro B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3'), baseados na sequência parcial do gene *ssu rDNA*, com desnaturação inicial a 94 °C, por 1 minuto, seguida por 40 ciclos contendo desnaturação a 94 °C, por 45 segundos, anelamento a 55 °C, por 45 segundos, e extensão a 72 °C, por 45 segundos; extensão final a 72 °C, por 5 minutos (OLMEDA *et al.*, 1997).

Para a família Anaplasmatacea, foram utilizados os *primers* baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA: EHR16SD (5'- GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC – 3') e EHR16SR (5'- TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC – 3') e para *Anaplasma platys*, os *primers* PLATYS (5' - GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG – 3') e EHR16SR (5'- TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC – 3'), com desnaturação inicial a 94 °C, por 2 minutos, seguida por 35 ciclos (para *A. platys* 40 ciclos) desnaturação a 94 °C, por 60 segundos, anelamento a 54 °C, por 30 segundos, e extensão a 72 °C, por 30 segundos, e extensão final a 72 °C, por 5 minutos (BROWN *et al.*, 2001).

Para *Leishmania* spp., foram usados os *primers* obtidos do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), sense 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AA -3', e os antisense 5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3' e 5'-CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC-3', com desnaturação inicial a 94 °C, por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos, anelamento a 63 °C, por 30 segundos, e extensão a 72 °C, por 30 segundos, e extensão final a 72 °C, por 5 minutos (DEGRAVE *et al.*, 1994).

Todas as reações de amplificação foram realizadas com o uso de reagentes Promega[®], em volume total final igual a 25 µL, contendo uma mistura de 2,5 µL do DNA-amostra, 2,5 µL de cada deoxinucleotídeo (2 mM), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 µM), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (1,25 U), 5 µL de tampão da PCR (PCR buffer 5X) e 12,1 µL de água ultrapura, totalizando 25 µL. Esses processos foram realizados em aparelho termociclador², no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando kit³, seguindo o protocolo para purificação de DNA em solução, conforme a recomendação do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose a 1,5% e por leitura de absorbância no comprimento de onda UV de 312 nm.

Todos os protocolos de PCR foram testados e ajustados em procedimentos pilotos, utilizando controles positivos (amostras com diagnósticos comprovados pela visualização dos agentes em esfregaços de sangue periférico), fornecidos pelo

² Biocycler – modelo - MJ25+ - Biosystems – Brasil.

³ Purelink PCR Purification Kit – Invitrogen.

Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras positivas foram enviadas para sequenciamento na Macrogen[®], Coreia do Sul, sendo as sequências obtidas triadas para montagem dos contigs no aplicativo CAP3 e analisadas quanto à homologia e similaridade com outras sequências depositadas no GenBank, com o auxílio do aplicativo Blast.

2.5 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA/UFV, processo nº 22/2013, em 25/04/2013.

3. Resultados

Das 100 amostras analisadas pela técnica da PCR, 80 apresentaram um ou mais hematozoários, com nenhuma das amostras se apresentando positiva para *Leishmania* sp. (Tabela 1).

Tabela 1 – Diagnóstico molecular (PCR) de hematozoários em amostras sanguíneas de cães trombocitopênicos (% ou nº absoluto)

Hematozoários	Nº de Amostras Positivas
<i>Babesia</i> spp.	3
<i>Ehrlichia</i> spp.	3
<i>Ehrlichia canis</i>	38
<i>Hepatozoon</i> sp.	8
<i>Babesia</i> spp. + <i>Ehrlichia</i> spp.	1
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> sp.	2
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Babesia</i> spp.	7
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Hepatozoon</i> sp.	9
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Anaplasma platys</i>	3
<i>Anaplasma platys</i> + <i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> sp.	1
<i>Babesia</i> spp. + <i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> sp.	1
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Babesia</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> sp.	4
Nenhum hematozoário	20
Total	100

Nota: PCR = reação em cadeia da polimerase.

Amostras dos produtos da PCR da família Anaplasmatacea, dos gêneros *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon* e das espécies *E. canis* e *A. platys*, foram enviadas para sequenciamento na Macrogen[®] (Coreia do Sul), sendo as sequências obtidas triadas para obtenção dos contigs no aplicativo CAP3 e posterior verificação de identidade no aplicativo BLAST[®]. Quando mais de uma sequência de cada gênero ou espécie foi obtida, elas foram submetidas ao alinhamento múltiplo no programa ClustalW2, resultando na identificação de 13 amostras ou isolados circulantes (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências de hematozoários selecionadas e depositadas no GenBank

Agente	Amostras	Código de Acesso GenBank
<i>Anaplasma</i> sp.	Ervália	KP642751
<i>Anaplasma platys</i>	Labclin_DVT	KP642756
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Viçosa	KP642755
<i>Babesia canis vogeli</i>	UFV 01	KP642757
	UFV 02	KP642758
<i>Ehrlichia canis</i>	UFV 01	KP642752
	UFV 02	KP642753
	UFV 03	KP642754
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Lapem_UFV	KP642750
<i>Hepatozoon canis</i>	DVT_UFV 01	KP233215
	DVT_UFV 02	KP642759
	DVT_UFV 03	KP642760
<i>Rangelia vitalii</i>	Lapem	KP642761

4. Discussão

A ocorrência de quatro gêneros de parasitas hematozoários, *Anaplasma*, *Babesia*, *Ehrlichia* e *Hepatozoon*, foi identificada pela técnica da PCR nas amostras de sangue coletadas de cães trombocitopênicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Tabela 1).

Constatou-se a presença de *E. canis* em 61% dos pacientes avaliados, valor este superior aos encontrados por Wen et al. (1997), Ramos et al. (2009) e Ueno et al. (2009), que obtiveram 57, 44 e 40%, respectivamente; e inferior aos 76,8% obtidos por Diniz et al. (2007).

A erliquiose é uma doença grave caracterizada por episódios hemorrágicos em sua fase crônica e tem alto índice de letalidade (HARRUS et al., 1997), gerando grande sofrimento aos animais e, conseqüentemente, aos donos. A presença marcante desse patógeno nos animais trombocitopênicos da microrregião de Viçosa preocupa e reforça

a necessidade do emprego de técnicas de diagnóstico mais sensíveis na rotina laboratorial veterinária.

Alguns animais apresentaram somente um, enquanto outros foram positivos para dois ou três patógenos, demonstrando que as coinfeções são muito comuns em cães nessa região, o que pode ser justificado pelo fato de esses agentes apresentarem carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* como vetores comuns. Mundim *et al.* (2008) detectaram coinfeções em animais naturalmente infectados com *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* sp. em 17,39% dos animais avaliados, e *Hepatozoon* sp. + *Ehrlichia* spp. + *Babesia* spp. em 3,48%, sendo estes dados muito semelhantes aos resultados encontrados em neste estudo. Ainda em relação à coinfeção de *E. canis* com outros patógenos, Ramos *et al.* (2009) encontraram 32% de coinfeção entre *E. canis* e *A. platys*, resultado muito superior aos 3% verificados em neste trabalho. Outros estudos demonstraram coinfeções com percentuais variáveis para *Hepatozoon* sp. e *Babesia* spp. (VASCONCELOS, 2010; COSTA, 2011). Costa (2011) relatou infecções com três desses agentes em cães com trombocitopenia. O autor detectou um único caso de *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *Hepatozoon* sp. dentre 150 animais, ou 0,67 % das amostras analisadas, índice semelhante a 1% encontrado nesta pesquisa. A presença de coinfeções relatadas neste trabalho, incluindo agentes com potencial zoonótico (SILVEIRA *et al.*, 2015), mostra a importância do uso rotineiro de técnicas diagnósticas mais sensíveis, como a PCR no rastreamento dos possíveis agentes envolvidos nos casos suspeitos de hemoparasitoses, para que os tratamentos possam ser mais eficazes, abrangendo todos os agentes envolvidos.

Das 100 amostras analisadas, 20 mostraram-se negativas para os agentes pesquisados (Tabela 1). Este resultado pode ser, em parte, atribuído à presença de patógenos que não foram alvos deste estudo e que são sabidamente conhecidos por levarem à trombocitopenia, como o vírus da cinomose (KRAKOWKA *et al.*, 1985), muito comum na região. Outra hipótese, bastante provável, é a de que parte dos animais pesquisados apresentava uma pseudotrombocitopenia, ou seja, o número de plaquetas contado pelo analisador hematológico estava falsamente diminuído, devido a problemas pré-analíticos, como coleta demorada, homogeneização ineficiente, satelitismo plaquetário e indução de aglutinação pelo EDTA (DUSSE *et al.*, 2004), que eventualmente podem não ser identificados na observação microscópica dos esfregaços sanguíneos. Cohen *et al.* (2000), em estudos com pessoas internadas em hospitais, constataram que 17% das trombocitopenias com número de plaquetas abaixo de

100.000/ μ L eram, na verdade, pseudotrombocitopenias. Esses dados ajudam a explicar o fato de parte das amostras com número de plaquetas baixo ter o exame da PCR negativo para os agentes pesquisados.

Todas as amostras testadas para *Leishmania*, pela técnica da PCR, apresentaram resultado negativo. Este resultado era esperado, pois no último inquérito entomológico realizado na região não foram identificadas espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão da leishmaniose visceral canina (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL, 2014). Embora haja relatos de cães diagnosticados no Hospital Veterinário da UFV, estes casos normalmente estão relacionados a animais provenientes de regiões endêmicas (ou seja, são casos importados).

Com o auxílio do sequenciamento dos produtos amplificados, confirmamos os resultados observados na reação da PCR com resultados de homologia e similaridade com diversas sequências dos gêneros *Anaplasma*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon* e *Rangelia*, o que confirma, na maioria dos produtos, até o nível de espécie os agentes das hemoparasitoses caninas presentes na região aqui estudada. Todas essas sequências foram analisadas e depositadas no GenBank (Tabela 2).

Todas as amostras positivas para *Hepatozoon* confirmaram a presença do *H. canis*. Esses dados são semelhantes a vários outros estudos realizados em todo o Brasil, os quais identificaram o *H. canis* como agente da hepatozoonose em diversas unidades da federação, quais sejam: Distrito Federal (PALUDO *et al.*, 2003), Espírito Santo (MASSARD, 1979), Goiás (MUNDIM *et al.*, 2008), Mato Grosso do Sul (SALGADO, 2006), Minas Gerais (MUNDIM *et al.*, 1992), Rio de Janeiro (O'DWYER *et al.*, 2001), Rio Grande do Sul (LASTA *et al.*, 2009), São Paulo (RUBINI *et al.*, 2005) e Pernambuco (RAMOS *et al.*, 2010). Os resultados deste estudo apresentam pela primeira vez os isolados de *Hepatozoon canis* presentes na região de Viçosa, num total de três isolados distintos, mesmo número de sequências obtidas por Chiareli (2009) em estudo com cães na capital federal. O isolado DVT_UFV 01 apresentou 99% de identidade com o *Curupira 3* (CRIADO-FORNELO, 2006), o DVT_UFV 02 e DVT_UFV 03 apresentaram 100% de identidade com o *Curupira 3*, sendo o DVT_UFV 02 também 100% similar ao *Botucatu* (RUBINI, 2009).

As amostras com PCR positivas para *E. canis* resultaram, após sequenciamento, em três isolados, UFV 01, UFV 02 e UFV 03 (Tabela 9). A UFV 01 apresentou 100% de identidade com as amostras de São Paulo, Brasil, *strain Brazil-CO1* e *strain Brazil-CO2* (DINIZ *et al.*, 2007) e com outras dezenas de amostras de países sul-americanos,

africanos, europeus e asiáticos. Para a sequência UFV 02, verificou-se 100% de identidade com a amostra brasileira *Clone Bctick7*, obtida de carrapato. A sequência UFV 03 apresentou identidade de 100% com as amostras *Clone Bcdog1* e *Clone Bcdog2* de Mossoró, RN e *strain 56C* do Rio de Janeiro, Brasil (FERREIRA, 2014) tendo também 100% de identidade com isolados de outros países.

As amostras positivas para *Ehrlichia* spp. e negativas para *E. canis*, quando sequenciadas, mostraram-se positivas para *E. chaffeensis*, o que corresponde a cerca de 10% das erliquias encontradas em nossa rotina. Neste estudo, elas foram encontradas de forma isolada e em associação com *H. canis* e *B. canis vogeli*. Também pela primeira vez na região de Viçosa foi identificada por PCR e sequenciamento a espécie *A. phagocytophilum*, descrita pela primeira vez no Brasil em 2011 (SANTOS, 2011). A presença de *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis* merece atenção especial, visto serem apontados como patógenos potencialmente zoonóticos, sendo a *E. chaffeensis* o agente da erliquiose monocítica humana (SEXTON *et al.*, 1998; PATEL; BIRD, 1999) e o *A. phagocytophilum* agente da erliquiose granulocítica humana (DUMLER *et al.*, 1995). No caso do isolado de *E. chaffeensis*, a sequência apresentou 100% de identidade com seis isolados obtidos de humanos nos Estados Unidos (*West Place, Wakulla, Saint Vincent, Liberty, Jax e Hearyland*). A sequência de *A. phagocytophilum* apresentou, de acordo com a análise realizada com o aplicativo Blast, 100% de identidade com dezenas de sequências depositadas no GenBank, dentre as quais a *Clone gw1*, sequência obtida de uma paciente sul-coreana com anaplasmoose granulocítica humana confirmada (KIM *et al.*, 2014).

Com o auxílio do sequenciamento dos produtos de PCR, confirmou-se, como esperado, a presença da subespécie *B. canis vogeli* em todas as amostras, com resultado positivo para *Babesia* spp., com exceção de uma. Os isolados UFV 01 e UFV 02 apresentaram, respectivamente, 98% e 100% de identidade com a sequência obtida por Passos (2005). Uma das amostras sequenciadas apresentou grande identidade (99% - 100%) com as sequências de *Rangelia vitalii* depositadas no GenBank. A presença desse agente na região de Viçosa, confirmada pela sequência obtida, também é bastante relevante, uma vez que até o momento há pouquíssimas sequências de origem brasileira depositadas no GenBank (DA SILVA *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2014), com apenas um depósito de duas sequências obtidas na Argentina (EIRAS *et al.*, 2014). Como o diagnóstico da babesiose ainda é, muitas vezes, realizado com base no resultado de formas intraeritrocitárias em esfregaços sanguíneos corados, sem a adoção de testes

moleculares confirmatórios, tem-se a possibilidade de que uma considerável parte dos cães enfermos decorrentes da infecção supostamente por *Babesia* spp., possa estar, na verdade, acometida por *R. vitalli*. Neste caso especificamente, além da *R. vitalii*, o animal teve a presença confirmada de *E. canis* e *Hepatozoon* sp. por PCR, sendo esse último caracterizado no sequenciamento como *H. canis*, constituindo assim uma infecção tripla. Esses resultados reforçam a urgência da implantação de testes moleculares na rotina laboratorial, bem como a necessidade dos profissionais de saúde aprofundarem estudos sobre a patogenia causada por esses agentes, para que protocolos terapêuticos mais específicos sejam aplicados aos casos confirmados.

5 Conclusões

Dentro das condições do experimento, pode-se concluir que:

- a) a presença de mais de um hematozoário nos cães trombocitopênicos é muito frequente, devendo ser considerada nas condutas terapêuticas;
- b) o principal agente da erliquiose canina na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, é a *Ehrlichia canis*;
- c) o agente da hepatozoonose canina na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, é o *Hepatozoon canis*;
- d) os agentes com potencial zoonótico, *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis* estão presentes em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais; e
- e) parte dos cães diagnosticados com babesiose pode estar acometida por *Rangelia vitalii*.

CAPÍTULO 2 – ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS RELACIONADAS ÀS HEMOPARASITOSE CANINAS

1. Introdução

Erliquiose, babesiose e hepatozoonose são hemoparasitoses comuns entre os cães domésticos, sendo, no Brasil, transmitidas por carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2013). As coinfeções entre esses agentes não são incomuns, devendo ser consideradas no diagnóstico e no tratamento, com estudo mostrando que as alterações na hematopoiese são potencializadas quando da presença de mais de um agente concomitantemente (DE TOMMASI, 2014).

2. Metodologia

2.1 Amostras

Entre os meses de março de 2013 e janeiro de 2014, foram obtidas amostras de sangue com trombocitopenia importante, apresentando contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ L, de 100 cães de raças e idades variadas, originários da microrregião de Viçosa, Minas Gerais, sendo 56 fêmeas e 44 machos.

2.2 Local de processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária e no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos da Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Hematologia

As amostras de sangue com EDTA foram processadas em analisador hematológico HumacountPlus®⁴, para obtenção dos seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), hemácias (HTM), volume

⁴ *Human count plus*, Human do Brasil Ltda.

corpúscular médio (VCM), hemoglobina corpúscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpúscular média (CHCM), índice de anisocitose eritrocitária (RDW), plaquetas, plaquetócrito (PCT), índice de anisocitose plaquetária (PDW), volume plaquetário médio (VPM) e contagem de leucócitos. A proteína plasmática total (PT) foi mensurada em refratômetro⁵. Também foram confeccionados e corados esfregaços sanguíneos (Panótico[®]), nos quais foi feita a contagem diferencial de leucócitos.

2.4 Extração de DNA e PCR (reação em cadeia da polimerase).

A extração de DNA de sangue total foi feita por meio do kit⁶, conforme recomendações do fabricante. O DNA extraído foi identificado e armazenado a -20°C, até a realização das PCRs.

A amplificação do DNA de bactérias do gênero *Ehrlichia* foi realizada por meio da técnica PCR, segundo Dawson *et al.* (1994); a do gênero *Hepatozoon* foi feita conforme Inokuma *et al.* (2002) e a da *Babesia* spp. de acordo com Olmeda *et al.* (1997).

2.5 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). A comparação entre os métodos de diagnósticos foi realizada pelo coeficiente *kappa*, utilizando o PROC FREQ.

Para a análise dos parâmetros sanguíneos entre os animais infectados e não infectados foi utilizada a análise de variância (PROC GLM), seguindo o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + E_i + H_j + B_k + E_i * H_j + E_i * B_k + H_j * B_k + e_{ijkl}$$

em que Y_{ijk} é a resposta observada; μ é a constante geral; E_i é o efeito do i -ésimo nível de *Ehrlichia*; H_j é o efeito do j -ésimo nível de *Hepatozoon*; B_k é o efeito do k -ésimo nível de *Babesia*; $E_i * H_j$ é a interação de *Ehrlichia* e *Hepatozoon*; $E_i * B_k$ é a interação de *Ehrlichia* e *Babesia*; $H_j * B_k$ é a interação de *Hepatozoon* e *Babesia*; e_{ijkl} é o erro aleatório.

⁵ *Clinical refractometers n° 140 - Fuji Optical Electronics CO. LTD*, Tóquio, Japão.

⁶ Wizard Genomic DNA Purification – Promega Corporation.

Para avaliar os efeitos dos parâmetros sanguíneos sobre as probabilidades de diagnóstico positivo para cada infecção, foi realizada a regressão logística multivariada (PROC LOGISTIC). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

2.6 Aspectos éticos

O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA/UFV, processo nº 22/2013 e aprovado em 25/04/2013.

3. Resultados

A Tabela 3 apresenta o resultado da PCR no diagnóstico dos hematozoários pesquisados.

Tabela 3 – Diagnóstico molecular (PCR) de hematozoários em amostras sanguíneas de cães trombocitopênicos (n = 100)

Hematozoários	Nº de Amostras Positivas
<i>Babesia</i> spp.	3
<i>Ehrlichia</i> spp.	44
<i>Hepatozoon canis</i>	8
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Babesia</i> spp.	8
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Hepatozoon canis</i>	12
<i>Ehrlichia</i> spp. + <i>Babesia</i> spp. + <i>Hepatozoon canis</i>	5
Não parasitado	20
Total	100

Na Tabela 4 estão os dados relativos aos índices hematológicos dos animais positivos e negativos para erliquiose, hepatozoonose e babesiose, e negativos para os patógenos pesquisados.

Verificou-se que o volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média apresentaram valores menores ($p < 0,05$) nos animais com *Ehrlichia* spp., sendo a contagem de metamielócito maior ($p < 0,05$) nos animais negativos para esse hematozoário. Nenhum parâmetro hematológico apresentou diferença estatística nos animais infectados ou não com *Hepatozoon* sp. As contagens de metamielócitos e neutrófilos bastonetes mostraram-se maiores ($p < 0,05$) nos animais com *Babesia* spp. que nos animais negativos.

Tabela 4 – Índices hematológicos nos cães diagnosticados ou não com hematozoários (média ± erro-padrão da média)

Variáveis	<i>Erhlichia</i> spp.		<i>Hepatozoon</i> sp.		<i>Babesia</i> spp.	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
HTM (milhões/ μ L)	4,9 \pm 0,3 ^a	4,3 \pm 0,2 ^a	4,5 \pm 0,3 ¹	4,6 \pm 0,2 ¹	4,5 \pm 0,3 ^A	4,5 \pm 0,2 ^A
HGB (g/dL)	11,1 \pm 0,6 ^a	9,6 \pm 0,4 ^a	10,1 \pm 0,6 ¹	10,2 \pm 0,4 ¹	10,1 \pm 0,6 ^A	10,0 \pm 0,4 ^A
HCT (%)	32,9 \pm 1,9 ^a	28,5 \pm 1,2 ^a	29,7 \pm 1,9 ¹	30,4 \pm 1,3 ¹	30,0 \pm 1,9 ^A	29,2 \pm 1,0 ^A
VCM (fL)	68,2 \pm 0,9 ^a	66,4 \pm 0,7 ^b	67,0 \pm 1,1 ¹	67,0 \pm 0,5 ¹	67,4 \pm 1,0 ^A	64,8 \pm 0,8 ^A
HCM (pg)	23,1 \pm 0,3 ^a	22,6 \pm 0,3 ^b	22,8 \pm 0,4 ¹	22,6 \pm 0,2 ¹	22,8 \pm 0,4 ^A	22,1 \pm 0,3 ^A
CHCM (%)	33,8 \pm 0,3 ^a	34,0 \pm 0,2 ^a	34,0 \pm 0,3 ¹	33,7 \pm 0,2 ¹	33,9 \pm 0,3 ^A	34,1 \pm 0,2 ^A
RDW	13,5 \pm 0,2 ^a	13,5 \pm 0,2 ^a	13,4 \pm 0,3 ¹	14,0 \pm 0,2 ¹	13,4 \pm 0,3 ^A	14,0 \pm 0,2 ^A
PLT (mil/ μ L)	66,8 \pm 4,0 ^a	58,6 \pm 3,2 ^a	60,7 \pm 4,6 ¹	62,2 \pm 3,0 ¹	60,0 \pm 4,5 ^A	67,1 \pm 3,3 ^A
PCT (%)	0 ^a	0 ^a	0 ¹	0 ¹	0 ^A	0 ^A
VPM (fL)	5,8 \pm 0,2 ^a	6,4 \pm 0,2 ^a	6,2 \pm 0,2 ¹	6,3 \pm 0,2 ¹	6,2 \pm 0,3 ^A	6,0 \pm 0,1 ^A
PDWc	27,3 \pm 1,0 ^a	31,3 \pm 0,8 ^a	30,2 \pm 1,2 ¹	29,6 \pm 0,9 ¹	30,0 \pm 1,2 ^A	30,1 \pm 0,7 ^A
LG (mil/ μ L)	8,2 \pm 1,0 ^a	11,1 \pm 0,9 ^a	10,3 \pm 1,4 ¹	9,9 \pm 0,6 ¹	10,3 \pm 1,3 ^A	9,5 \pm 0,8 ^A
MIEL (mil/ μ L)	0 ^a	0 ^a	0 ¹	0 ¹	0 ^A	0 ^A
META (mil/ μ L)	29,7 \pm 23,5 ^a	0 ^b	12,3 \pm 15,2 ¹	0 ¹	2,6 \pm 4,3 ^B	44,0 \pm 21,2 ^A
BAST (mil/ μ L)	895,7 \pm 426,1 ^a	662,1 \pm 138,1 ^a	895,1 \pm 328,7 ¹	252,7 \pm 48,5 ¹	673,3 \pm 238,8 ^B	1055,6 \pm 327,2 ^A
NEUT (mil/ μ L)	4974,8 \pm 644,9 ^a	7396,9 \pm 758,4 ^a	6912,8 \pm 1136,5 ¹	5845,9 \pm 369,7 ¹	6811,9 \pm 1017,8 ^A	5775,6 \pm 716,2 ^A
LIN (mil/ μ L)	1263,4 \pm 210,5 ^a	1978,5 \pm 260,0 ^a	1446,0 \pm 249,5 ¹	2689,4 \pm 345,5 ¹	1792,6 \pm 370,4 ^A	1569,1 \pm 123,6 ^A
MON (mil/ μ L)	591,3 \pm 86,5 ^a	860,2 \pm 97,7 ^a	738,5 \pm 129,9 ¹	891,8 \pm 92,5 ¹	797 \pm 136,4 ^A	670,9 \pm 71,1 ^A
EOS (mil/ μ L)	449,6 \pm 141,0 ^a	264,5 \pm 49,1 ^a	227,6 \pm 65,5 ¹	604,8 \pm 104,2 ¹	327 \pm 97,3 ^A	294,8 \pm 77,1 ^A
BAS (mil/ μ L)	0 ^a	1,8 \pm 1,8 ^a	0 ¹	5,0 \pm 3,0 ¹	1,5 \pm 2,4 ^A	0 ^A
PT (g/dL)	7,6 \pm 0,2 ^a	7,6 \pm 0,2 ^a	7,5 \pm 0,2 ¹	7,9 \pm 0,2 ¹	7,5 \pm 0,3 ^A	7,8 \pm 0,1 ^A

Nota: Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa a $P < 0,05$; números diferentes na linha indicam diferença significativa a $P < 0,05$; letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa a $P < 0,05$. HTM: hemácias (hematimetria); HGB: hemoglobina; HCT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: índice de anisocitose eritrocitária; PLT: plaquetas; PCT: plaquetócrito; VPM: volume plaquetário médio; PDWc: índice de anisocitose plaquetária; LG: leucócitos (leucometria global); MIEL: mielócito; META: metamielócito; BAST: neutrófilo bastonete; NEUT: neutrófilo segmentado; LIN: linfócito; MON: monócito; EOS: eosinófilo; BAS: basófilo; e PT: proteína.

Na Tabela 5 estão os índices hematológicos dos animais com erliquiose e dos animais negativos para os patógenos pesquisados.

Tabela 5 – Índices hematológicos nos cães com *Ehrlichia* spp. e sem hematozoários (média ± erro-padrão da média)

Variáveis	Negativo para os Hematozoários Pesquisados (n = 20)	Positivos para <i>Ehrlichia</i> spp. (n = 44)
Hemácias (milhões/ μ L)	4,81 \pm 0,37 ^a	4,20 \pm 0,24 ^a
Hemoglobina (g/dL)	10,88 \pm 0,78 ^a	9,56 \pm 0,55 ^a
Hematócrito (%)	32,38 \pm 2,41 ^a	28,14 \pm 1,62 ^a
Volume globular médio (fL)	68,30 \pm 1,33 ^a	67,09 \pm 0,84 ^a
Hemoglobina globular média (pg)	22,89 \pm 0,43 ^a	22,95 \pm 0,34 ^a
Concentração de hemoglobina globular média (%)	33,55 \pm 0,45 ^a	34,16 \pm 0,21 ^a
RDW	13,42 \pm 0,30 ^a	13,19 \pm 0,25 ^a
Plaquetas (mil/ μ L)	64,55 \pm 5,11 ^a	57,30 \pm 3,99 ^a
Plaquetócrito (%)	0,04 \pm 0,004 ^a	0,04 \pm 0,003 ^a
Volume plaquetário médio (fL)	5,49 \pm 0,24 ^b	6,52 \pm 0,22 ^a
PDWc	26,31 \pm 1,08 ^b	31,94 \pm 1,03 ^a
Leucócitos (mil/ μ L)	7,56 \pm 1,26 ^a	11,74 \pm 1,30 ^a
Mielócito (mil/ μ L)	0,00 ^a	0,00 ^a
Metamielócito (mil/ μ L)	10,90 \pm 10,90 ^a	0,00 ^a
Neutrófilo bastonete (mil/ μ L)	736,30 \pm 391,21 ^a	864,68 \pm 206,42 ^a
Neutrófilo segmentado (mil/ μ L)	4970,75 \pm 867,95 ^a	8115,50 \pm 1058,08 ^a
Linfócito (mil/ μ L)	1045,55 \pm 164,25 ^a	1628,36 \pm 246,63 ^a
Monócito (mil/ μ L)	533,60 \pm 91,76 ^a	853,23 \pm 126,47 ^a
Eosinófilo (mil/ μ L)	285,05 \pm 63,92 ^a	168,07 \pm 32,17 ^a
Basófilo (mil/ μ L)	0,00 ^a	0,00 ^a
Proteína (g/dL)	7,50 \pm 0,24 ^a	7,37 \pm 0,22 ^a

Nota: Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa a $P < 0,05$; RDW: índice de anisocitose eritrocitária; e PDWc: índice de anisocitose plaquetária.

O VPM e o PDWc mostraram-se maiores nos animais diagnosticados com *Ehrlichia* spp. em relação aos animais negativos para os hematozoários pesquisados.

Ao realizar análises para verificar a influência das coinfeções sobre os parâmetros hematológicos, verificou-se a ocorrência de interações significativas ($P < 0,05$), como apresentado a seguir (Tabela 6).

Na coinfeção *Ehrlichia* spp. – *Babesia* spp. foram constatadas interações para os parâmetros VCM, metamielócito e neutrófilo bastonete.

Tabela 6 – Média \pm erro-padrão da média do volume corpuscular médio (fL), metamielócito e neutrófilo bastonete na interação *Ehrlichia* spp. – *Babesia* spp.

Volume Corpuscular Médio (VCM)		
	Sem <i>Ehrlichia</i> spp.	Com <i>Ehrlichia</i> spp.
Sem <i>Babesia</i> spp.	67,7 \pm 1,0 ^{a1}	67,1 \pm 0,7 ^{a1}
Com <i>Babesia</i> spp.	72,5 \pm 1,9 ^{a1}	64,0 \pm 1,7 ^{a2}
Metamielócito		
	Sem <i>Ehrlichia</i> spp.	Com <i>Ehrlichia</i> spp.
Sem <i>Babesia</i> spp.	5,5 \pm 7,8 ^{b1}	0 ^{a1}
Com <i>Babesia</i> spp.	229,2 \pm 234,7 ^{a1}	0 ^{a2}
Neutrófilo bastonete		
	Sem <i>Ehrlichia</i> spp.	Com <i>Ehrlichia</i> spp.
Sem <i>Babesia</i> spp.	407,8 \pm 283,5 ^{b1}	563,7 \pm 166,4 ^{a1}
Com <i>Babesia</i> spp.	4239,0 \pm 3492,9 ^{a1}	375,2 \pm 128,8 ^{a2}

Nota: Letras diferentes na coluna diferem ($P < 0,05$); e números diferentes na linha diferem ($P < 0,05$).

Os animais com coinfeção *Babesia* spp.-*Ehrlichia* spp. apresentaram VCM menor ($p < 0,05$) que aqueles com infecção somente por *Babesia* spp. Os animais com *Babesia* apresentaram contagens de metamielócitos maiores ($p < 0,05$) que as contagens nos animais sem os hematozoários *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. e com coinfeção pelos dois hematozoários. Os animais com *Babesia* spp. apresentaram contagens de neutrófilos bastonetes maiores ($p < 0,05$) que as contagens nos animais sem os hematozoários *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. e com coinfeção por esses dois agentes.

De acordo com as análises para cálculo da probabilidade de ocorrência do evento diagnóstico positivo de hemoparasitose na PCR, foram obtidos os resultados a seguir.

Para *Ehrlichia* spp., verificaram-se duas variáveis com alterações significativas ($P < 0,05$), sendo:

- HCT_vr = Hematócrito classificado pelo valor de referência em abaixo do normal (0) ou normal (1); e
- PDWc = Índice de anisocitose plaquetária.

A probabilidade de ocorrência do evento, no caso de diagnóstico positivo para *Ehrlichia* spp. na PCR, é dada pela fórmula:

$$Probabilidade = \frac{e^{(-2,4280)+(-1,5103 \times HCT_{vr})+(0,1252 \times PDWc)}}{1 + e^{(-2,4280)+(-1,5103 \times HCT_{vr})+(0,1252 \times PDWc)}}$$

Sendo *Odds Ratio* ou Razão de Chances:

a) $HCT_{vr} = 4,5248868778281 \sim 4,5$

Esse dado indica que cães com hematócrito abaixo do normal têm 4,5 vezes mais chances de serem diagnosticados com *Ehrlichia* spp. do que cães com hematócrito normal.

b) $PDWc = 1,13337510542192 \sim 1,13$

Esse fato significa que o incremento em uma unidade do valor de PDWc aumenta em 1,13 vez as chances do cão ser diagnosticado com *Ehrlichia* spp.

Para *Babesia* spp., considerando a variável significativa ($P < 0,05$): MCV_vr – volume globular médio classificado pelo valor de referência em abaixo do normal(0) ou normal (1), a probabilidade de ocorrência do evento, no caso de diagnóstico positivo para *Babesia* spp. na PCR, é dada pela fórmula:

$$Probabilidade = \frac{e^{(-0,2272)+(-1,4870 \times MCV_{vr})}}{1 + e^{(-0,2272)+(-1,4870 \times MCV_{vr})}}$$

Sendo *Odds Ratio* ou Razão de Chances: $MCV_{vr} = 4,4247787610620 \sim 4,4$.

Ou seja, cães com volume globular médio abaixo do normal têm 4,4 vezes mais chances de ser diagnosticados com *Babesia* spp. do que cães com volume globular médio normal.

4. Discussão

Com relação a *Ehrlichia* spp., os parâmetros metamielócito e neutrófilo bastonete apresentaram-se maiores ($p < 0,05$) nos animais negativos para a bactéria do que nos animais com erliquiose (Tabela 4). Esses dados indicam uma presença maior de desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (DNNE) nos animais sem *Ehrlichia* spp., porém poderia estar relacionada às outras hemoparasitoses observadas no estudo.

Os índices hematológicos dos animais com e sem hepatozoonose não apresentaram diferença estatística (Tabela 4), assim como em outros estudos que compararam animais com e sem *H. canis* (PALUDO *et al.*, 2003; O'DWYER *et al.*, 2006), diferentemente de outros autores que descreveram leucocitose e neutrofilia nos

seus experimentos em cães com hepatozoonose (GONDIM *et al.*, 1998; MUNDIM *et al.*, 2008).

Os animais trombocitopênicos com erliquiose apresentaram o VPM e o PDWc maiores que os animais sem os hematozoários pesquisados. Bommer *et al.* (2008), em estudos com cães trombocitopênicos clinicamente saudáveis e doentes, observaram relação negativa entre VPM e PDW com a contagem de plaquetas (ou seja, o tamanho aumenta com a diminuição do número), não tendo sido detectada influência das enfermidades sobre esses parâmetros, ao contrário do aqui apresentado (Tabela 5). No entanto, Evans e Smith (1991), em estudo com cães saudáveis da raça Beagle, não verificaram relação entre a contagem de plaquetas e os parâmetros PCT, VPM e PDW, nem diferenças relacionadas ao sexo dos animais. A presença de plaquetas maiores e anisocitose plaquetária mostram que os índices plaquetários podem ajudar médicos veterinários a diferenciar casos de trombocitopenias por hematozoários de outras causas, como a pseudotrombocitopenia. Faz-se necessário que novos estudos sejam realizados no sentido de estabelecer faixas de referências de normalidade desses parâmetros, de maneira que estes passem a integrar os laudos de hematologia.

Na coinfeção *Ehrlichia spp.*-*Babesia spp.*, constatou-se MCV menor nos animais com os dois patógenos que o MCV dos animais com a presença de organismos do gênero *Babesia* e sem a presença do gênero *Ehrlichia spp.* (Tabela 6). O fato de a erliquiose ser caracterizada por produzir anemia normocítica, normocrômica, não regenerativa (GARCIA-NAVARRO, 2005; NEER; HARRUS, 2006), enquanto a babesiose pode desencadear anemia regenerativa (CARLI *et al.*, 2009) e microcítica (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006), indica a necessidade de atenção a dados hematológicos direcionando a combinação destas informações nos casos, não incomuns, de coinfeção. Neste sentido, o histórico de exames desses animais pode ser bastante útil na análise da alteração de um VCM, por exemplo.

Os animais com presença de *Babesia spp.* e ausência de *Ehrlichia spp.* apresentaram DNNE ($p < 0,05$) maior que o dos animais com a presença dos dois agentes, e DNNE ($p < 0,05$) ainda maior que o de cães com ausência desses patógenos (Tabela 6). Esses dados estão em concordância com os de outros autores que relacionaram a babesiose à neutrofilia com DNNE (ZYGNER *et al.*, 2007), uma vez que os parâmetros citados não estão alterados na coinfeção com a *Ehrlichia spp.*, podendo estar relacionados às características hematológicas observadas na erliquiose, em que na fase crônica ocorre hipoplasia medular, levando a ocorrência de anemia e leucopenia

(TROY; FORRESTER, 1990; ANDEREG; PASSOS, 1999; STILES, 2000). Assim, a resposta medular quando da ocorrência da coinfeção parece tender para um quadro mais relacionado a essa enfermidade, ou seja, a falta de resposta medular.

Constatou-se que no diagnóstico da erliquiose cães com hematócrito abaixo do normal têm mais chances de ser diagnosticados com *Ehrlichia* spp. do que cães com hematócrito normal. Esse resultado corrobora os dados de vários autores que relacionaram a erliquiose à anemia (CASTRO, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004; BORIN *et al.*, 2009). O incremento do PDWc também aumenta as chances de diagnóstico da *Ehrlichia* spp., podendo significar que os cães com erliquiose apresentam maior anisocitose plaquetária. Assim, este dado, somado à presença de trombocitopenia, pode auxiliar no diagnóstico diferencial dessa hemoparasitose. Faltam estudos para determinar os valores de referência desse parâmetro hematológico, o que dificulta sua interpretação.

Na babesiose, as análises estatísticas indicam que cães com MCV abaixo da referência têm mais chances de ser diagnosticados com esse patógeno, estando a enfermidade relacionada à anemia microcítica. Esse resultado corrobora com os de Vasconcelos (2010), que encontrou predominantemente anemia microcítica, normocrômica, diferindo dos resultados de Furlanello *et al.* (2005), que relataram a anemia normocítica, normocrômica, como a mais frequente. Dados divergentes com relação à resposta medular podem estar relacionados a infecções por subespécies diferentes, ou mesmo por outras espécies semelhantes, como a *Rangelia vitalii*.

5 Conclusões

Dentro das condições do experimento, pode-se concluir que:

a) a trombocitopenia parece estar intimamente ligada às hemoparasitoses caninas estudadas, principalmente à erliquiose;

b) a presença de mais de um hematozoário nos cães trombocitopênicos é muito frequente, devendo ser considerada nas condutas terapêuticas;

c) os animais com e sem *H. canis* não apresentam diferenças significativas nos parâmetros hematológicos; e

d) os animais trombocitopênicos com erliquiose apresentam volume plaquetário médio e PDWc maiores do que os animais sem hematozoários.

CAPÍTULO 3 - CENTRIFUGAÇÃO POR GRADIENTE DE DENSIDADE NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATOOZONOSE E ERLIQUIOSE CANINA

1. Introdução

A hepatozoonose e a erliquiose estão entre as enfermidades mais frequentes diagnosticadas nos laboratórios veterinários da região de Viçosa, sendo a coinfeção simultânea pelos dois hematozoários relatada com alguma frequência (MUNDIM *et al.*, 1992; VASCONCELOS, 2010). No entanto, o diagnóstico pela pesquisa desses agentes em esfregaços sanguíneos corados por microscopia tem revelado ser um método pouco sensível, quando comparado a técnicas moleculares (RAMOS *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ, 2010; O'DWYER, 2011). Desta maneira, no intuito de encontrar um método mais sensível e que possa ser empregado em laboratórios de análises clínicas de pequeno e médio porte, testou-se a centrifugação por gradiente de densidade como método alternativo.

2 Metodologia

2.1 Amostras

Foram utilizadas 100 amostras de sangue de cães de raças e idades variadas, dos sexos masculino e feminino, com trombocitopenia severa (plaquetas < 100.000/ μ L), coletadas entre março de 2013 e janeiro de 2014.

2.2 Local de coleta das amostras

As amostras de sangue foram colhidas de cães do atendimento rotineiro no setor de Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário e analisadas no Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária e no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos da Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Esfregaço sanguíneo de sangue periférico (SP)

As amostras de sangue com EDTA foram homogeneizadas por inversão manual durante 1 minuto, sendo posteriormente confeccionados os esfregaços em lâmina de vidro previamente desengordurada e seca. Após a secagem dos esfregaços, estes foram corados com corantes do tipo Romanowsky (Panótico), segundo a metodologia preconizada pelo fabricante, e deixados para secar ao ar.

2.4 Capa de leucócitos

O esfregaço com a capa de leucócitos foi confeccionado a partir da centrifugação de microcapilar com sangue total a 10.000 rpm, por 5 minutos, em microcentrífuga, com sua quebra na posição do creme leucocitário. A confecção, a coloração e a secagem do esfregaço foram feitas como descrito no item anterior.

2.5 Centrifugação por gradiente de densidade

Uma parte das amostras foi destinada à CGD, realizada da seguinte forma: 2mL de sangue com EDTA + 2 mL de solução salina balanceada foram homogeneizados. Em seguida, essa mistura foi adicionada vagarosamente a 2 mL de Ficol-Paque Plus[®] em um tubo de 10 mL, sendo esse tubo centrifugado a 2.000 rpm, por 20 minutos. Após a centrifugação formou-se o anel contendo os mononucleares, que foi capturado com pipeta e colocado em outro tubo de 5 mL, contendo 4,5 mL de solução salina balanceada. Depois de cuidadosamente homogeneizado por inversão, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 1.100 rpm, sendo o sobrenadante descartado logo em seguida. Foram acrescentados 4,5mL de solução salina e, então, repetiu-se a operação. O sobrenadante foi descartado, acrescentando 5µL de plasma do animal ao sedimento. Deste sedimento foi confeccionado e corado um esfregaço, como descrito nos itens 3.3 e 3.4.

2.6 Pesquisa de hematozoários

A pesquisa foi realizada com o auxílio de microscópio de luz (Olympus CX31, Japão), em 100 campos com aumento de 400 vezes e 100 campos com aumento de 1.000 vezes, nas lâminas de SP, CL e CGD, sendo os resultados anotados em planilha.

2.7 Extração de DNA

A extração de DNA do sangue total foi realizada com reagentes apropriados, de acordo com as recomendações do fabricante⁷, sendo o DNA extraído, identificado e armazenado em freezer a -20°C, até o momento de uso.

2.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações do DNA de bactérias do gênero *Ehrlichia* e do protozoário *Hepatozoon* foram realizadas como descrito a seguir: para *Ehrlichia* spp., a amplificação foi realizada segundo Murphy et al. (1998), utilizando os *primers* baseados na sequência parcial do gene 18SrDNA, ECC (5'-GAA CGA ACG CTG GCG GCA AGC-3') e ECB (5'- CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3'); para *Hepatozoon* spp., a técnica foi executada de acordo com Inokuma et al. (2002), com os *primers* baseados na sequência parcial do gene 18S rDNA, presente em todos os hepatozoons, HepF (5'-ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC - 3') e HepR (5'-CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG - 3').

2.9 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). A comparação entre os métodos de diagnósticos foi realizada pelo coeficiente *kappa*, utilizando o PROC FREQ. O nível de confiança adotado foi $\alpha = 0,05$.

2.10 Aspectos éticos

O projeto de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em 25 de abril de 2013, sob o número 22/2013.

⁷ Wizard Genomic DNA Purification – Promega Corporation.

3 Resultados e discussão

Na Tabela 7 estão os resultados da pesquisa de organismos dos gêneros *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* sp. no sangue periférico (SP), na capa de leucócitos (CL), na centrifugação por gradiente de densidade (CGD) e na PCR.

Tabela 7 – Resultados da ocorrência de *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* sp. utilizando as técnicas da PCR, CGD, CL e SP em % ou número absoluto (N = 100)

Técnicas de Diagnóstico	Agente		
	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Ehrlichia</i> spp.+ <i>Hepatozoon</i> sp.
	Número de amostras positivas		
PCR	69	25	17
CGD	15	18	2
CL	8	9	1
SP	6	4	1

Nota: PCR = reação em cadeia da polimerase; CGD = centrifugação por gradiente de densidade; CL = capa de leucócitos; SP = sangue periférico; e coinfeção = *Ehrlichia* spp. + *Hepatozoon* sp., simultaneamente.

A Figura 1 ilustra um gamonte de *Hepatozoon* sp. em leucócito e a Figura 2, uma mórula de *Ehrlichia* spp. dentro de monócito, ambas agentes obtidos em esfregaços originados da técnica de CGD.



Figura 1 – Gamonte de *Hepatozoon canis* em célula sanguínea (seta), 1.000x.

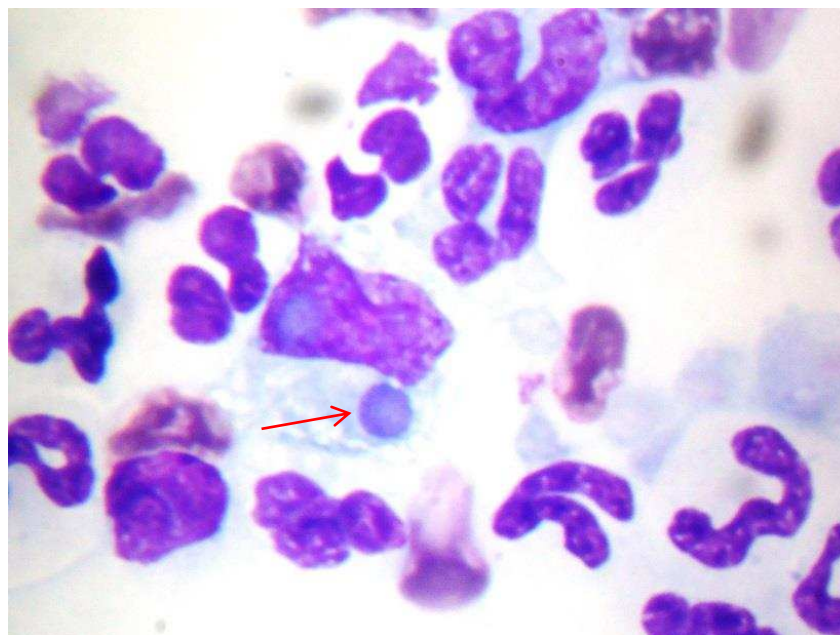


Figura 2 – Mórula de *Ehrlichia* em monócito (seta), 1.000x.

Como esperado, a técnica a PCR mostrou-se mais sensível no diagnóstico, com 69 amostras positivas para *Ehrlichia* spp. e 25 para *Hepatozoon* sp., vindo a seguir a CGD, com 15 e 18, respectivamente.

Na detecção direta de mórulas de *Ehrlichia* spp. em sangue periférico de animais trombocitopênicos ou com suspeita de hemoparasitoses, o resultado encontrado com índice de 6% foi inferior ao índice de 7,1% verificado por Ueno *et al.* (2009), 8% por Mylonakis *et al.* (2003) e 9% por Ramos *et al.* (2009), sendo superior aos 4% encontrado por Hernández (2010). Na pesquisa em capa de leucócitos constatou-se grande variação nos índices encontrados. Neste estudo, o percentual de positividade de 8% na detecção direta foi superior aos encontrados por diversos pesquisadores: Elias (1991), Silveira (1992) e Sainz-Rodriguez (1996), e inferior aos 66% de Mylonakis *et al.* (2003).

O *H. canis* tem sido esporadicamente relatado no Brasil em alguns trabalhos, muitas vezes aparecendo como relato de caso (LASTA *et al.*, 2009; AGUIAR *et al.*, 2004), sendo sua prevalência imprecisa. Massard (1979), em estudo com esfregaços sanguíneos de cães de áreas rurais e urbanas, encontrou prevalência de 31,58% e 4,48%, respectivamente, e em 2001, O'Dwyer e colaboradores relataram 39,2%, em estudo com cães de áreas rurais do Rio de Janeiro, Brasil.

Estudos de hepatozoonose em cães trombocitopênicos são raros, uma vez que a trombocitopenia não é característica comum entre os cães acometidos de forma isolada

pelo *H. canis*. Desta maneira, a amostragem de sangue canino com trombocitopenia não é adequada para estudos de hepatozoonose, a não ser que esses estudos englobem outros agentes comumente associados a essa infecção e sabidamente associados à trombocitopenia em infecção por *Ehrlichia* spp. Desta forma, os dados expostos na Tabela 1 não devem ser interpretados como relativos à prevalência desse agente, mas sim como dados comparativos entre as técnicas de diagnósticos em estudo e como indicativos de que sua associação com *Ehrlichia* spp. é bastante comum, visto que 17 das 25 amostras positivas para *Hepatozoon* sp. também foram positivas para *Ehrlichia* spp. Os patógenos da família Anaplasmatacea e o *H. canis* parecem ter coexistência bastante harmoniosa, chegando a parasitar de forma simultânea a mesma célula (Figura 3). Esse resultado tem se repetido algumas vezes na rotina do Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária da UFV (Aécio Carlos de Oliveira, comunicação pessoal⁸).



Figura 3 – Mórulas de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. (setas curtas) e gamonte de *Hepatozoon canis* presentes em uma mesma célula (seta longa), 1000x.

A Tabela 8 apresenta o nível de concordância entre a pesquisa de mórulas de *Ehrlichia* spp. em SP, CL e CGD e a PCR, segundo o teste de Kappa.

⁸ Farmacêutico – Bioquímico, Laboratório Clínico, DVT – UFV.

Tabela 8 – Nível de concordância, pelo teste de Kappa, entre as técnicas SP, CL e CGD com a PCR no diagnóstico de *Ehrlichia* spp.

Hematozoário	<i>Ehrlichia</i> spp.	
Técnica	PCR (valor de Kappa)	P-valor
SP	0,0558	0,0452
CL	0,0752	0,0240
CGD	0,1469	0,0024

Nota: SP = sangue periférico; CL = capa de leucócitos; CGD = centrifugação por gradiente de densidade; PCR = reação em cadeia da polimerase; Kappa: < 0 = sem concordância; 0 a 0,19 = pobre; 0,2 a 0,39 = razoável; 0,4 a 0,59 = moderada; 0,60 a 0,79 = substancial; e 0,8 a 1,0 = quase perfeita.

Fonte: Landis, J. R.; Koch, G. G. *The measurement of observer agreement for categorical data*. *Biometrics* v. 33, p. 159-174, 1977.

A pesquisa de mórulas de *Ehrlichia* spp. em CGD obteve concordância pobre, a mesma de SP e CL, quando comparada à PCR, não demonstrando aumento na sensibilidade do diagnóstico. Este resultado pode ser devido à ação mecânica e às propriedades tóxicas do Ficoll-Paque Plus[®] sobre parte das células, levando à sua lise e à dificuldade de concentração de células parasitadas, uma vez que elas são em número extremamente reduzido. Na Figura 4 tem-se a imagem de uma mórula extracelular encontrada algumas vezes durante a microscopia, o que contribui para a afirmação de lise de algumas células.



Figura 4 – Mórula de *Ehrlichia* spp. extracelular (seta). 1.000x

Na Tabela 9 tem-se o nível de concordância entre a pesquisa de gamontes de *Hepatozoon* sp. em SP, CL e CGD e a PCR, segundo o teste de Kappa.

Tabela 9 – Nível de concordância, pelo teste de Kappa, entre as técnicas SP, CL e CGD e a PCR no diagnóstico de *Hepatozoon* sp.

<i>Hepatozoon</i> sp.		
Técnica	PCR (valor de Kappa)	P-valor
SP	0,2222	0,0002
CL	0,4576	<0,0001
CGD	0,6765	<0,0001

Nota: SP = sangue periférico; CL = capa de leucócitos; CGD = centrifugação por gradiente de densidade; PCR = reação em cadeia da polimerase; Kappa: < 0 – sem concordância; 0 a 0,19 = pobre; 0,2 a 0,39 = razoável; 0,4 a 0,59 = moderada; 0,60 a 0,79 = substancial; e 0,8 a 1,0 = quase perfeita.

Fonte: Landis, J. R.; Koch, G. G. *The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics*, v. 33, p. 159-174, 1977.

Os resultados que mostram que a CGD obteve classificação de concordância substancial com a PCR no diagnóstico da hepatozoonose, sendo superior à concordância razoável do SP e moderada da CL, indicam que a CGD possui sensibilidade superior à das técnicas tradicionais utilizadas na pesquisa deste hematozoário. Essa técnica, de fácil implementação em laboratórios de análises clínicas, mesmo que pequenos, não exige alta qualificação da mão de obra e nenhum equipamento especial para seu processamento, como os exigidos na PCR. Também é uma técnica relativamente rápida, podendo o resultado da pesquisa de hematozoários ser entregue em poucas horas, no mesmo dia da coleta da amostra sanguínea. Nos laboratórios com estrutura adequada à realização de testes moleculares e/ou quando o tempo de entrega e o custo do exame não for empecilho, as técnicas moleculares continuam como ótima opção, devido às altas sensibilidades e especificidades dos testes.

4 Conclusões

a) A técnica por centrifugação por gradiente de densidade mostrou-se eficiente no diagnóstico da hepatozoonose canina, obtendo concordância substancial com a PCR.

b) A centrifugação por gradiente de densidade não se mostrou eficaz no diagnóstico da erliquiose.

c) Os agentes *Hepatozoon* sp. e *Ehrlichia* spp. são frequentes nos animais trombocitopênicos da microrregião de Viçosa, MG, sendo a coinfeção entre esses patógenos bastante comum.

3 Conclusões gerais

a) A técnica de centrifugação por gradiente de densidade mostrou-se eficiente no diagnóstico da hepatozoonose canina, obtendo concordância substancial com a PCR.

b) A ocorrência da trombocitopenia parece estar intimamente ligada às hemoparasitoses, principalmente à erliquiose.

c) A presença de mais de um hematozoário nos cães trombocitopênicos é muito frequente, devendo ser considerada nas condutas terapêuticas.

d) A erliquiose induz a alterações significativas nos índices plaquetários, no volume plaquetário médio e no PDWc.

e) O principal agente da erliquiose canina na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, é a *Ehrlichia canis*.

f) O agente da hepatozoonose canina na microrregião de Viçosa, Minas Gerais, é o *Hepatozoon canis*.

g) *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis*, reconhecidos como potencialmente zoonóticos, estão presentes em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais.

h) Parte dos cães diagnosticados com babesiose pode estar acometida por *Rangelia vitalii*.

4 Referências bibliográficas

- AGUIAR, D. M.; RIBEIRO, M. G.; SILVA, W. B.; DIAS JR., J. G.; MEGID, J.; PAES, A. C. Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 56, n. 3, p. 411-413, 2004.
- AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. *In vitro* isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 489-493, 2008.
- ALMEIDA, G. P.; ALVAREZ, R. H. Métodos de separação de espermatozoides para escolha do sexo dos animais domésticos. **B. Indústr. Anim.**, v. 60, n. 1, p.107-115, 2003.
- ALVES, A. L. G.; VIEIRA, M. E. M.; BARREIRA, A. P. B.; MOTA, L. S. L. S.; SAITO, M. E.; KOHAYAGAWA, A.; HUSSNI, C. A.; WATANABE, M. J.; OLIVEIRA, P. G. G. Protocolo de isolamento de células mononucleadas da medula óssea de equinos. **Vet. e Zootec.**, v. 16, n. 4, p. 650-655, out. 2009.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: a revisão. **Clín. Vet.**, São Paulo, v. 19, p. 31-38, 1999.
- BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap.14, p. 181.
- BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 11, p.365-370, 1997.
- BANETH, G.; SHKAP V.; SAMISH, M.; PIPANO, E.; SAVITISKY, I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 74, n. 2-4, p. 299-305, 1998.
- BANETH, G.; BARTA, J. R.; SHKAP, V.; MARTIN, D. S.; MACINTIRE, D. K.; VINCENT-JOHNSON, N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1298-1301, 2000.
- BENTLEY, C. A. Preliminary note upon a Leucocytozoan of the dog. **Br. Med. J**, v. 1, p. 988, 1905a.
- BENTLEY, C. A. A new leucocytozoan of the dog. **Br. Med. J**, v. 1, n. 2314, p. 1018, 1905b.
- BOMMER, N.X.; SHAW, D. J.; MILNE, E. M.; RIDYARD, A. E. Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. **J. Small Anim. Pract**, v. 49, p. 518-524, 2008.
- 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.

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

BROWN, G. K.; MARTIN, A. R.; ROBERTS, T. K.; AITKEN, R. J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 79, n. 8 p. 554-558, August 2001.

BROWN, G. K.; MARTIN, A. R.; ROBERTS, T. K.; AITKEN, R. J.; DUNSTAN, R. H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 83 p. 101-102. 2005.

CACCIÒ, S.M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANJILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. R.; SLEMENDA, S. B.; PIENIASEK, N. J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 285-292, 2002.

CARLI, E.; TASCA, S.; TROTTA, M.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 162, p. 51-57, 2009.

CARINI, A.; MACIEL, J. Sobre a moléstia dos cães, chamada Nambi-Uvú e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). **An. Paul. Med. Cir.**, v. 3, p. 65-71, 1914.

CARLOS, R. S. A.; MUNIZ NETA, E. S.; ESPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L. S.; BRITO, R. L. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. P. Frequência de Anticorpos anti- *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e Antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães no micro região Ilhéus – Itabuna, Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

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

CASTRO, M. B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) ou Moslikovki 1945.** 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: patologia animal) – FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, 1997.

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

CHIARELI, R. A. **Investigação clínico-laboratorial e molecular da infecção por *Hepatozoon canis* em cães da região periurbana de Brasília.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009.

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.

COHEN, A. M.; CYCOWITZ, Z.; MITTELMAN, M.; LEWINSKI, U. H.; GARDYN, J. The incidence of pseud thrombocytopenia in automatic blood analyzers. **Haematologia**, v. 30, n. 2, p. 117-121, 2000.

COSTA, H. X. **Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

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

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SALANÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol.**, v. 113 p. 189-201, 2003.

DA SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; COSTA, M. M.; PAIM, C. B.; PAIM, F. C.; DORNELLES, G.L.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M. B.; MAZZANTI, C. M.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. **Exp. Parasitol.**, v. 128, n. 4, p. 347-352, 2011.

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

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRE, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

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

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Paras. Vect.**, v. 6, n. 213, 2013.

DAVOUST, B., BONI, M., PARZY, D. Apport du laboratoire au diagnostic de l'ehrlichiose monocyttaire canine. **Rev. Fr. Lab.**, v. 310, p. 25-32, 1999.

DAWSON, J. E.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W.; WARNER, C.; BIGGIE, K.; DAVIDSON, W. R.; LOCKHART, J. M.; NELTLES, V. F.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 11, p. 2725-2728, nov. 1994.

DE TOMMASI, A. S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; TASCA, S.; CANTACESSI, C.; BREITSCHWERDT, E. B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; CAPELLI, G.; DE CAPRARIIS, D. Evaluation of blood and bone

marrow in selected canine vector-borne diseases. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 1, p. 534, 2014.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. G. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-469, 1994.

Diretoria de Vigilância Ambiental/Superintendência de Vigilância Epidemiológica, Ambiental e Saúde do Trabalhador/Subsecretaria de Vigilância e Proteção a Saúde/Secretaria de Estado da Saúde – memorando nº 737/2014, MG, 2014.

DINIZ, P. P. V. P. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 7, n. 4, p. 689-97, 2007.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H. MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the DSB Gene. **J. Molec. Diagn.**, v. 7, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; RICHTER, P.; KINSEY, R.; MADIGAN, J. E. Serologic Cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic *Ehrlichia*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33. n. 5, p. 1098-1103, 1995.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; STUART, C.R.; 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. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Pseudotrombocitopenia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 40, n. 5, 2004.

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

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, v. 33, p. 540-553, 1991.

EGENVALL, A.; BJÖERSDORFF, A.; LILLIEHÖÖK, I.; ENGVALL E. O.; KARLSTAM, E.; ARTURSSON, K.; HEDHAMMAR, A.; GUNNARSSON, A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. **Vet. Rec.**, v. 143, n. 15, p. 412-417, 1998.

EGENVALL, A.; LILLIEHÖÖK, I.; BJÖERSDORFF, A.; ENGVALL, E. O.; KARLSTAM, E.; ARTURSSON, K.; HELDTANDER, M.; GUNNARSSON, A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. **Vet. Rec.**, v.146, n.7, p.186-190, 2000b.

EVANS, G. O.; SMITH, D. E. Platelet measurements in healthy beagles, canis familiars. **Comp. Haematol. Int.**, v. 1, p. 49-51, 1991.

EWING, S. A.; PANCIERA, R. J.; MATHEW, J. S.; CUMMINGS, C. A.; KOCAN, A. A. American canine hepatozoonosis: an emerging disease in the New World. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 916, p. 81-92, 2000.

FARIA, J. L. M.; DAGNONE, A. S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; CASTRO T. X.; FERREIRA, E. O.; NEVES, F. P.; BARBOSA, A. V.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. Genetic diversity of Ehrlichia canis strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 301-308, jul.-set. 2014.

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. Parasitol.**, v. 145, n. 1-2, p. 21-30, 2007

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of north eastern Italy. **Vet. Parasitol.**, v. 134, p. 77-85, 2005.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Hemograma. In: _____. **Manual de hematologia veterinária**. 2 ed. São Paulo: Varela, Cap. 5, p. 79-100, 2005.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Hemograma. In: _____. **Manual de hematologia veterinária**. 2 ed. São Paulo: Varela, Cap. 7, p. 119-120, 2005.

GONDIM, L. F. P.; KOHAYAGAWA A.; ALENCAR, N. X.; BIONDO, A. W.; TAKAHIRA, R. K.; FRANCO, S. R. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Vet. Parasitol.**, v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GUIMARÃES, J. C.; ALBERNAZ A. P.; MACHADO, J. A.; JUNIOR, O. A. M.; GARCIA, L. N. N. Aspectos clinico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13 (suppl. 1), p. 229, 2004.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 360-363, 1997.

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por Ehrlichia cani: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. 2005. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HERNANDEZ, G. V. **Detecção parasitológica, molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em cães da região centro-oriental da Colômbia.** 2010. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, 2010.

HUNFELD, K.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. S. Babesiosis: recente insights into an ancient disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 1219-1237, 2008.

IBRAHIM, N. D. G.; RAHAMATHULLA, P. M.; NJOKU, C. O. Neutrophil myeloperoxidase deficiency associated with canine hepatozoonosis. **Intern. J. Parasitol.**, v. 19, p. 915-918, 1989.

INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, p. 815-817, 2001.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, n. 3, p. 265-271, 2002.

INOKUMA, H.; YOSHIZAKI, Y.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; OKUDA, M.; ONISHI, T. Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3494-3498, 2003.

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

KARAGENC, T. I.; PASA, S.; KIRLI, G.; HOSGOR, M.; BILGIC, H. B.; OZON, Y. H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean Coast of Turkey. **Vet. Parasitol.**, v. 135, n. 2, p. 113-119, 2006.

KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; CALDAS, H. C.; LEAL, J. C. F. GOLONI-BERTOLLO, E. M.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; ABBUD FILHO, M.; SANTOS, I. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 23, n. 1, p. 29-34, 2008.

KIM, K. H.; YI, J.; OH, W. S.; KIM, N. H.; CHOI, S. J.; CHOE, P. G.; KIM, N. J.; LEE, J. K.; OH, M. D. Human granulocytic anaplasmosis, South Korea, 2013. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 20, n. 10, p. 1708-1711, oct. 2014.

KJEMTRUP, A. M.; CONRAD, P. A. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. **Vet. Parasitol.**, v. 138, p. 112-117, 2006.

KRAKOWKA, S.; AXTHELM, M. K.; JOHNSON, G. C. Canine distemper virus. In: OLSEN, R. G.; KRAKOWKA, S.; BLAKESLEE, J. R. (Ed.). **Comparative pathobiology of viral diseases.** Boca Raton: CRC press, 1985. p. 137-164.

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, n. 2, p. 189-195, 2007.

LASTA, C. S.; SANTOS, A. P.; MELLO, F. P. S.; LACERDA, L. A.; MESSICK, J. B.; GONZALEZ, F. H. D. Infecção por *Hepatozoon canis* em canino doméstico na região sul do Brasil confirmada por técnicas moleculares. **Cienc. Rural**, v. 39, n. 9, p. 2135-2140, 2009.

LEVINE, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2. ed. Minneapolis: Burgess Publishing, 1973. p. 406.

LI, Y.; WANG, C.; ALLEN, K. E.; LITTLE, S. E.; AHLUWALIA, S. K.; GAO, D.; MACINTIRE, D. K.; BLAGBURN, B. L.; KALTENBOECK, B. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. **Vet. Parasitol.**, v. 157, n. 1-2, p. 50-58, 2008.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. Cryptosporidium spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 8, n. 3, p. 791-800, 2003.

LINSCOTT, A. J. Molecular diagnostics for infectious disease. **Pathol. Case Rev.**, v. 7, n. 2, p. 64-9, 2002.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **Compendium**, v. 20, p. 418-432, 1998.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 134, p. 193-213, 2005.

MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M.; FREIRE, I. M.; LINHARES, G. F.; ALMEIDA, N. K.; ALMOSNY, N. R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R. C.; RISTIC, M.; COX, D.; McDADE, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **N. Engl. J. Med.**, v. 316, n. 14, p. 853-856, 1987.

MAKIMURA, S.; KINJO, H. Cytochemical identification of canine circulating leucocytes parasitized by the gametocyte of *Hepatozoon canis*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 53, n. 5, p. 963-965, 1991.

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

MASSUNG, R. F.; SLATER, K.; OWENS, J. H.; NICHOLSON, W. L.; MATHER, T. N.; SOLBERG, V. B.; OLSON, J. G. Nested PCR assay for detection of granulocytic Ehrlichiae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 4, p.1090-1095, 1998.

- MATHEW, J. S.; EWING, S. A.; MALAYER, J. R.; FOX, J. C.; KOKAN, K. M. Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 456-459, 2000.
- MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Série – Biologia molecular. Atualização Parte 2 – Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004.
- 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. e Zootec.**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.
- MUNDIM, A. V.; JACOMINI, J. O.; MUNDIM, M. J. S.; ARAÚJO, S. F. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. **J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29 (supl.), p. 359-361, 1992.
- MUNDIM, A. V.; MORAIS, I. A.; TAVARES, M. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa. A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, n. 1-2, p. 3-8, 2008.
- MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, v. 79, n. 4, p. 325-339, 1998.
- MURATA, T.; SHIRAMIZU, K.; HARA, Y.; INOUE, M.; SHIMODA, K.; NAKAMA, S. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 53, p. 1097-1099, 1991.
- MURATA, T.; INOUE, M.; KANO, M.; KONO, Y.; ISHIDA, M.; HORIO, M.; SHIMADA, M.; YOKOYAMA, M.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Ultrastructure and cytochemical characteristics of leukocyte infected with *Hepatozoon canis*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 55, n. 6, p. 1043-1045, 1993.
- MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.
- NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; FERRO, J. A.; LABRUNA, M. B.; CHRYSAAFIDIS, A. L.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 2, p. 75-79, 2010.
- NEER, M. T.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia infection. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 203-216.
- O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; PEREIRA DE SOUZA, J. C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

O'DWYER, L. H.; SAITO, M. E.; HASEGAWA, M. Y.; KOHAYAGAWA, A. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 688-690, 2006.

O'DWYER, L. H. Brazilian canine hepatozoonosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 20, n. 3, p. 181-193, jul.-set. 2011.

OLIVEIRA, D.; TIE NISHIMORI, C.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. Anti- *Ehrlichia canis* antibodies detection by "Dot-ELISA" in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

OLMEDA, A. S.; ARMSTRONG, P. M.; ROSENTHAL, B. M.; VALLADARES, B.; DEL CASTILHO, A.; DE ARMAS, F.; MIGUELEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, J. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD III, S. R. A subtropical case of human babesiosis. **Acta Trop.**, v. 67, p. 229-234, 1997.

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PALUDO, G. R.; DELL'PORTO, A.; DE CASTRO E TRINDADE, A. R.; McMANUS, C.; FRIEDMAN, H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.3-4, p.243-248, 2003.

PALUDO, G.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO.; MACINTIRE, D. K.; WHITLEY, E. M.; BOUDREAUX, M. K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B. I.; DYKSTRA, C. C. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Paras. Res.**, v. 97, p. 167-170, 2005.

PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.

PASSOS-BUENO M. R. S.; MOREIRA, E. S. **Ferramentas básicas da genética molecular humana**. Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 43-67.

PATEL, R. G.; BYRD, M. A. Near fatal acute respiratory distress syndrome in a patient with human ehrlichiosis. **South Med. J.**, v, 92, n. 3, p. 333-335, 1999.

PEIRCE, M. A. Order piroplasmorida. In: LEE, J. J.; LEEDALE, G. F.; BRADBURY, P. (Ed.). **The illustrated guide to the Protozoa**. Vol. I, 2. ed. Society of Protozoologists, Lawrence, 2000. p. 347-353.

PEREZ, P.; BORDOR, M.; ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia canis* detection in symptomatic humans in Venezuela. In:International conference on rickettsiae and rickettsial diseases, Logroño, Espanha: American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005. p. 45.

PERSING, D. H. **PCR protocols for emerging infectious diseases**. A supplement to diagnostic molecular microbiology: Principles and applications. Washington, DC: ASM Press. 1996. p. 190.

PESTANA, B. R. O nambiuvú. **Rev. Méd. S. Paulo**, v. 22, p. 423-426, 1910.

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

RAMOS, R. *et al.* Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitol. Res.**, v. 7, n. 5, p. 1115-1120, 2010.

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 9, p. 2107-2112, 1994.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine Hepatozoon species from Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 91-93, 2005.

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.**, v. 164, p. 324-327, 2009.

SAINZ-RODRIGUEZ, A. **Aspectos clínicos y epizootiologicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiclina y el dipropionato de imidocarb.** 1996. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid, Madrid.

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) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2006.

SANTOS, H. A. **Diagnóstico da infecção por *Anaplasma phagocytophilum* (foggie, 1949) em cães domésticos e carrapatos de áreas urbanas e rurais na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.** 2011. Tese de doutorado, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT[®] 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SEXTON, D. J.; COREY, G. R.; CARPENTER, C.; KONG, L. Q.; GANDHI, T.; BREITSCHWERDT, E.; HEGARTY, B.; CHEN, S. M.; FENG, H. M.; YU, X. J.; OLANO, J.; WALKER, D. H.; DUMLER, S. J. Dual infection with *Ehrlichia chaffeensis* and a spotted fever group rickettsia: a case report. **E.I.D.**, v. 4, n. 2, p. 311-316, 1998.

SILVEIRA, C. A. **Ehrlichiose canina. Estudo clínico de uma população animal, na região urbana e rural de Setúbal – Implicações em Saúde Pública e Saúde Pública Veterinária.** 1992. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1992.

SILVEIRA, J. A. G.; VALENTE, P. C. L. G.; PAES, P. R. O.; VASCONCELOS, A. V.; SIVESTRE, B. T.; RIBEIRO, M. F. B. The first clinicals and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks Tick Borne Dis.**, jan. 2015. [in press].

SMITH, T. G.; KIM, B.; DESSER, S. S. Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 293-304, 1999.

SOARES, J. F.; DALL'AGNOL, B.; COSTA, F. B.; KRAWCZAK, F. S.; COMERLATO, A. T.; ROSSATO, B. C. D.; LINCK, C. M.; SIGAHI, E. K. O.; TEIXEIRA, R. H. F.; SONNE, L.; HAGIWARA, M. K.; GREGORI, F.; VIEIRA, M. I. B.; MARTINS, J. R.; RECK, J.; LABRUNA, M. B. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 202, n. 3-4, p. 156-163, 2014.

SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006.

STILES, J. Canine rickettsial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, St. Louis, v. 30, n. 5, p. 1135-1150, Sept. 2000.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGARIO, M. M.; SANTOS, A. L. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 43, v. 1, p. 73-84, 2007.

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, n. 1-2, p. 177-180, 2006.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1990. Cap. 37, 1990. p. 404-417.

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

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

UILENBERG, G. *Babesia* - A historical overview. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 138, p. 3-10, 2006.

VASCONCELOS M. F. **Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, 2010.

VINASACO, J.; LI, O.; ALVARADO, A.; DIAZ, D.; HOYOS, L.; TABACHI, L.; SIRIGIREDDY, K.; FERGUSON, C.; MORO, M. H. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 8, p. 2716-2719, Aug. 2007.

VINCENT-JOHNSON, N. A. American canine hepatozoonosis. **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 33, p. 905-920, 2003.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of *nested* PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WENYON, C. M. Some remarks on the genus *Leucocytozoon*. **Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 63-72, 1910.

WENYON, C. M. **Protozoology**: a manual for medical men, veterinarians and zoologists. New York: Wood, 1926.

WOZNIAK, E. J.; TELFORD JR., S. R.; McLAUGHLIN, G. L. Employment of the Polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine. **J. Zoo. Wildlife Med.**, v. 25, n. 4, p. 538-547, 1994.

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

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

ZYGNER, W.; GÓJSKA, O.; RAPACKA, G.; JAROS, D.; WEDRYCHOWICZ, H. Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 146-151, 2007.