



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

BRUNO VINICIOS SILVA DE ARAÚJO

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES DE POPULAÇÃO HOSPITALAR
E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA**

MOSSORÓ

2024

BRUNO VINICIOS SILVA DE ARAÚJO

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES DE POPULAÇÃO HOSPITALAR
E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Sanidade Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes

Coorientadora: Prof^a. Dra. Juliana Fortes Vilarinho Braga

MOSSORÓ

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A663f Araújo, Bruno Vinícios Silva de .
Frequência e caracterização molecular de
patógenos transmitidos por carrapatos em cães de
população hospitalar e sua correlação clínico-
epidemiológica / Bruno Vinícios Silva de Araújo. -
2024.
108 f. : il.

Orientador: João Marcelo Azevedo de Paula
Antunes Antunes.
Coorientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga
Braga.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2024.

1. Anaplasma platys. 2. Babesia vogeli. 3.
Ehrlichia canis. 4. Hepatozoon canis. 5. Análise
filogenética. I. Antunes, João Marcelo Azevedo de
Paula Antunes, orient. II. Braga, Juliana Fortes
Vilarinho Braga, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

BRUNO VINICIOS SILVA DE ARAÚJO

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES DE POPULAÇÃO
HOSPITALAR E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Sanidade Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Defendida em: 27 / 02 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JOAO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES**
Data: 22/05/2024 22:20:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente e Orientador

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA FORTES VILARINHO BRAGA**
Data: 23/05/2024 09:25:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juliana Fortes Vilarinho Braga, Prof^a. Dr^a. (UFPI)
Presidente e Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **ANA CARLA DIOGENES SUASSUNA BEZERRA**
Data: 24/05/2024 15:17:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra, Prof^a. Dr^a. (UFERSA)
Membro Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO DE ASSIS LEITE SOUZA**
Data: 23/05/2024 18:31:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Francisco de Assis Leite Souza, Prof. Dr. (UFRPE)
Membro Examinador

Dedico a minha tia Vilma Rodrigues (In Memoriam), a mulher que foi um exemplo de garra e determinação, uma segunda mãe que me acolheu e me ensinou a seguir firme.

À minha família, por todo incentivo, demonstração de amor e confiança.

AGRADECIMENTOS

Meu pai sempre disse que o que vem fácil vai fácil. Tem dias exaustivos que fico refletindo por um longo tempo o que isso quer dizer. Na minha realidade acho que quer dizer sacrifícios e escolhas, e uma frase que costumo usar como “mantra” no meu dia a dia reflete muito bem isso: “Toda vitória oculta uma abdicação”. A saudade da minha família e abrir mão de tempo de qualidade com pessoas que eu amo é a parte mais difícil de todo esse processo, mas sou grato a Deus por ter a melhor rede de apoio que eu poderia ter.

Sou grato ao seu Waldir e a dona Magna por serem os meus maiores incentivadores, por não medirem esforços para se fazerem presentes na minha vida e por terem me dado mais do que o necessário para eu correr atrás dos meus objetivos. Obrigado pelo colo, pelos conselhos e pelas orações, por sonharem ao meu lado e por todo o amor que recebo mesmo longe. Cresci ouvindo as seguintes frases de vocês: “Estude que você gosta de uma mordomia” e “A única coisa que você leva dessa vida é o conhecimento”. Sei que são frases meio clichês, mas foram esses dizeres diários (ou quase diários) que de certa forma fizeram eu perceber que o melhor e o mais seguro caminho para o crescimento é através do conhecimento.

Agradeço as minhas irmãs Carol, Brenda e Bárbara por toda palavra de incentivo, por me transmitirem tranquilidade e acalmarem meu coração nos momentos difíceis. Agradeço a minha família potiguar por terem me recebido de braços abertos e por serem tão calorosos e amáveis comigo, em especial à minha tia Fátima, tia Babá, tio Neném, tia Vilma (*In Memoriam*) e minhas primas Evelane e Ediane, obrigado pelo carinho, paciência e preocupação durante todos esses anos.

Ao Pablo Carvalho, por ser meu melhor amigo, companheiro e incentivador. Sempre digo que sonhar e crescer ao seu lado é a melhor parte dessa loucura que é a vida. Obrigado por todo apoio, carinho, palavras de incentivo e compreensão, por alegrar a minha vida nos dias bons e ruins. Te amo.

Aos meus queridos amigos Raylanne, Moisés e Lara. Obrigado pela amizade leve, pelas boas risadas, carinho, incentivo e por acima de tudo respeitar as nossas diferenças. Amo vocês.

Aos amigos Athos, Maressa e Bianca, sou grato pela amizade conquistada, pelas ótimas conversas, risadas e por toda ajuda no laboratório e nas coletas. Vocês tornaram meus plantões mais leves e divertidos. Meus chegados.

Ao Professor Sakamoto, meu “pai científico” e bom amigo, obrigado por todas as oportunidades na época da graduação, pela confiança, conselhos, paciência e convívio. O senhor foi fundamental para o meu crescimento como pesquisador.

À Professora Juliana Braga, minha querida orientadora e amiga, obrigado por ser uma mentora presente e empática, permitindo que minha experiência na pós-graduação superasse as minhas expectativas. O amor e dedicação que você tem pela pesquisa e docência são inspiradores, já falei e volto a repetir que a tenho como um exemplo de ser humano e profissional.

Ao meu orientador Professor João Marcelo, por ter me recebido de braços abertos na pós-graduação, se fazendo presente e sempre disposto a me ajudar. Obrigado pela amizade construída, pelas oportunidades, contatos e ensinamentos. Tive os melhores orientadores que eu poderia ter.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza do Laboratório de Diagnóstico Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por ter gentilmente cedido as amostras utilizadas como controles-positivos para as PCR neste estudo.

Ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pela disponibilidade e fornecimento do material necessário para a realização do sequenciamento e análise filogenética das amostras provenientes deste estudo.

À equipe do Hospital Veterinário Dix-Huit Rosado Maia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e do Hospital Veterinário Popular de Mossoró, por permitirem o acompanhamento dos atendimentos e a coleta das amostras utilizadas neste estudo. Esse período foi extremamente enriquecedor, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Agradeço a Banca Examinadora por suas enriquecedoras sugestões e por todas as discussões sobre o trabalho.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação

Simone de Beauvoir

RESUMO

Os cães são susceptíveis à infecção por vários agentes transmitidos por ixodídeos que carregam e transmitem grande variedade de patógenos, como os protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, e bactérias como *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, no entanto, ainda se observa uma escassez de estudos sobre a caracterização molecular dos patógenos envolvidos e suas correlações com os aspectos epidemiológicos e clínicos das doenças transmitidas por carrapatos no Nordeste do Brasil. Ante isso, o objetivo do presente estudo foi determinar a frequência, caracterização molecular e o perfil epidemiológico e clinicopatológico de cães monoinfectados, coinfectados e multi-infectados por *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* e/ou *H. canis* na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Para isso, 181 cães de população hospitalar sob suspeita clínica e/ou laboratorial de hemoparasitoses foram selecionados e amostras sanguíneas foram coletadas para determinação do hematócrito, contagem de plaquetas e extração de DNA para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para correlacionar as variáveis epidemiológicas, clinicopatológicas e o tipo de infecção foram utilizados os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher e a magnitude das associações foi estimada pelo *Odds ratio* seguida por regressão logística multinomial. A PCR revelou que 72,3% (131/181) dos cães estavam infectados por pelo menos um dos agentes pesquisados. Destes, 44,7% (81/181) estavam monoinfectados, 21,5% (39/181) coinfectados e 6,1% (11/181) multi-infectados. *E. canis* foi o agente mais detectado nos animais (41,9%, 76/181), seguido por *H. canis* (35,4%, 64/181), *A. platys* (21,5%, 39/181) e *B. vogeli* (7,7%, 14/181), onde 84,6% (33/39) dos animais coinfectados estavam parasitados concomitantemente por diferentes espécies de bactérias e protozoários. Os cães com histórico de carrapato possuíam 3,41 vezes mais chance de estarem coinfectados em comparação àqueles que não possuíam esse histórico. Multi-infecção (90,9%) e coinfecção (84,6%) foram mais frequentes em animais que não faziam uso de medicação carrapaticida, em comparação aos monoinfectados (56,8%) e não infectados (56%). Cães com sinais clínicos de epistaxe, hiporexia ou anorexia, onicogrifose, desidratação e presença de ectoparasitas apresentaram mais chance de estarem multi-infectados em comparação aos outros tipos de infecção. Dentre as variáveis hematológicas analisadas, a trombocitopenia apresentou alta prevalência em todos os tipos de infecção, tendo os cães multi-infectados 16,3 vezes mais chance de apresentarem esta condição, e cães coinfectados 2,11 vezes mais chance de apresentarem anemia. A relação filogenética do gene 16S rRNA das sequências recuperadas para *A. platys* e *E. canis* e do gene 18S rRNA para *B. vogeli* e *H. canis* demonstraram grande similaridade às amostras de referência para essas espécies de outras regiões do Brasil e do mundo. Este é o primeiro e o mais extenso trabalho a utilizar a PCR como método de diagnóstico da infecção por *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli* e *H. canis*, caracterizar filogeneticamente e analisar as características epidemiológicas e clinicopatológicas dos cães naturalmente infectados por esses patógenos, correlacionando com os diferentes tipos de infecção, considerando o número de agentes envolvidos. Em áreas com condições climáticas favoráveis ao *R. sanguineus* s.l., recomenda-se a investigação de um conjunto de patógenos envolvidos nas DTV, tendo em vista que as alterações clínicas e laboratoriais relatadas podem ser comuns nos diferentes tipos de infecção. Esses achados contribuem para um melhor entendimento do perfil epidemiológico e clinicopatológico dos cães infectados por um ou múltiplos patógenos transmitidos por carrapatos, permitindo uma melhor compreensão da dinâmica dessas doenças no semiárido Nordestino.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*; *Babesia vogeli*; *Ehrlichia canis*; *Hepatozoon canis*; Análise filogenética.

ABSTRACT

Dogs are susceptible to infection by several agents transmitted by ixodids that carry and transmit a wide variety of pathogens, such as the protozoa *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis*, and bacteria such as *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*. However, there is still a lack of studies on the molecular characterization of the pathogens involved and their correlations with the epidemiological and clinical aspects of tick-borne diseases in northeastern Brazil. Therefore, the objective of the present study was to determine the occurrence, molecular characterization and epidemiological and clinicopathological profile of dogs monoinfected, co-infected and multi-infected by *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* and/or *H. canis* in the city from Mossoró, Rio Grande do Norte. For this, 181 dogs from the hospital population under clinical and/or laboratory suspicion of hemoparasitosis were selected and blood samples were collected to determine hematocrit, platelet count and DNA extraction for use in the Polymerase Chain Reaction (PCR). To correlate the epidemiological and clinicopathological variables and the type of infection, the Chi-square or Fisher's exact tests were used and the magnitude of the associations was estimated by the Odds ratio followed by multinomial logistic regression. The PCR revealed that 72.3% (131/181) of the dogs were infected by at least one of the agents studied. Of these, 44.7% (81/181) were mono-infected, 21.5% (39/181) co-infected and 6.1% (11/181) multi-infected. *E. canis* was the most detected agent in animals (41.9%, 76/181), followed by *H. canis* (35.4%, 64/181), *A. platys* (21.5%, 39/181) and *B. vogeli* (7.7%, 14/181), where 84.6% (33/39) of coinfecting animals were concomitantly parasitized by different species of bacteria and protozoa. Dogs with a history of ticks were 3.41 times more likely to be co-infected compared to those without this history. Multi-infection (90.9%) and co-infection (84.6%) were more frequent in animals that were not using tick-killing medication, compared to mono-infected (56.8%) and non-infected (56%). Dogs with clinical signs of epistaxis, hyporexia or anorexia, onychogryphosis, dehydration and presence of ectoparasites were more likely to be multi-infected compared to other types of infection. Among the hematological variables analyzed, thrombocytopenia showed a high prevalence in all types of infection, with multi-infected dogs having a 16.3 times greater chance of presenting this condition, and co-infected dogs having a 2.11 times greater chance of presenting anemia. The phylogenetic relationship of the 16S rRNA gene of the sequences recovered for *A. platys* and *E. canis* and the 18S rRNA gene for *B. vogeli* and *H. canis* demonstrated great similarity to the reference samples for these species from other regions of Brazil and the world. This is the first and most extensive work to use PCR as a method for diagnosing infection by *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli* and *H. canis*, phylogenetically characterizing and analyzing the epidemiological and clinicopathological characteristics of dogs naturally infected by these pathogens, correlating with the different types of infection, considering the number of agents involved. In areas with climate conditions favorable to *R. sanguineus* s.l., it is recommended to investigate a set of pathogens involved in DTV, considering that the clinical and laboratory changes reported may be common in different types of infection. These findings contribute to a better understanding of the epidemiological and clinicopathological profile of dogs infected by one or multiple pathogens transmitted by ticks, allowing a better understanding of the dynamics of these diseases in the semi-arid Northeast.

Keywords: *Anaplasma platys*; *Babesia vogeli*; *Ehrlichia canis*; *Hepatozoon canis*; Phylogenetic analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* detectado em cães de população hospitalar provenientes de uma área no semiárido brasileiro, empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder, usando o programa IQ-TREE versão 2.2.0.3. Entre parênteses o número de acesso da sequência obtida neste estudo e de outras provenientes do banco de dados GenBank..... 68
- Figura 2.** Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 18S rRNA de *Babesia vogeli* detectado em cães de população hospitalar provenientes de uma área no semiárido brasileiro, empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder, usando o programa IQ-TREE versão 2.2.0.3. Entre parênteses o número de acesso da sequência obtida neste estudo e de outras provenientes do banco de dados GenBank..... 69
- Figura 3.** Árvore filogenética baseada nas sequências parciais de 16S rRNA de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* detectado em cães de população hospitalar provenientes de uma área no semiárido brasileiro, empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder, usando o programa IQ-TREE versão 2.2.0.3. Entre parênteses o número de acesso das sequencias obtidas neste estudo e de outras provenientes do banco de dados GenBank. 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Registros da ocorrência de erliquiose canina em cães domésticos no Brasil.....	23
Quadro 2. Registros da ocorrência de <i>A. platys</i> em cães domésticos no Brasil.....	28
Quadro 3. Registros da ocorrência da babesiose canina em cães domésticos no Brasil	31
Quadro 4. Registros da ocorrência de hepatozoonose canina em cães domésticos no Brasi	35

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Sequência de oligonucleotídeos, programas de amplificação e tamanho de produtos amplificados por PCR para beta-actina canina, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* utilizados nesta pesquisa..... 63
- Tabela 2.** Frequência de positividade à PCR associada aos tipos de infecção^Y em cães de população hospitalar naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em uma área do semiárido brasileiro, 2023 65
- Tabela 3.** Frequência da positividade à pesquisa direta em esfregaço sanguíneo associada aos tipos de infecção¹ em cães de população hospitalar naturalmente infectados por *Anaplasma* sp., *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp., *Hepatozoon* sp. em uma área do semiárido brasileiro, 2023 67

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Frequência e correlações entre variáveis epidemiológicas e tipos de infecções em cães naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* e atendidos no município de Mossoró/RN, 2023..... 87
- Tabela 2.** Frequência das alterações clínico patológicas e sua correlação com os tipos de infecções em cães naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* atendidos no município de Mossoró/RN, 2023..... 90
- Tabela 3.** Frequência e correlações entre alterações clínicas sistêmicas e os tipos de infecções em cães naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* atendidos no município de Mossoró/RN, 2023..... 106
- Tabela 4.** Frequência e correlações entre alterações hematológicas e tipos de infecções parasitárias causadas por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães atendidos no município de Mossoró/RN, 2023 94
- Tabela 5.** Análise multivariada multinomial* dos fatores associados aos tipos de infecção por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* atendidos no município de Mossoró/RN, 2023 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Actb	Beta-actina, do inglês <i>Actin</i> , <i>beta</i>
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HOVET	Hospital Veterinário
HT	Hematócrito
mL	Militro
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLT	Plaquetas
nPCR	<i>Nested</i> PCR
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	Ácido ribonucleio ribossômico
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido
UV	Ultravioleta
V	Volts
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
mM	Milimolar
ml	Mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES IXODÍDEOS EM CÃES	20
2.2 ERLIQUIOSE CANINA	21
2.2.1 Etiologia e epidemiologia	21
2.2.2 Patogenia e sinais clínicos	24
2.2.3 Diagnóstico	25
2.3 ANAPLASMOSE TROMBOCÍTICA CANINA	26
2.3.1 Etiologia e epidemiologia	26
2.3.2 Patogenia e sinais clínicos	28
2.3.3 Diagnóstico	29
2.4 BABESIOSE CANINA	30
2.4.1 Etiologia e epidemiologia	30
2.4.2 Patogenia e sinais clínicos	32
2.4.3 Diagnóstico	33
2.5 HEPATOOZINOSE CANINA	34
2.5.1 Etiologia e epidemiologia	34
2.5.2 Patogenia e sinais clínicos	36
2.5.3 Diagnóstico	36
2.6 HEMOPARASITÓSES DE CÃES E SAÚDE ÚNICA	37
REFERÊNCIAS	39
3 HIPÓTESE	56
4 OBJETIVOS	57
4.1 OBJETIVO GERAL	57
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
CAPÍTULO 1 - Patógenos transmitidos por <i>R. sanguineus</i> s.l. em monoinfecções, coinfeções e multi-infecções em cães no semiárido brasileiro: frequência e caracterização molecular	58
CAPÍTULO 2 - Fatores epidemiológicos e clinicopatológicos associados a infecção por múltiplos patógenos transmitidos por <i>R. sanguineus</i> s. l. em cães naturalmente infectados no semiárido nordestino, Brasil	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 17% das doenças infecciosas que ocorrem no mundo são transmitidas por artrópodes, evidenciando o papel das doenças transmitidas por vetores (DTVs) (Who, 2017) como inquestionáveis fatores na saúde global (Oliveira et al., 2020).

Diversos patógenos são transmitidos para animais e humanos através de vetores, sendo o carrapato um dos principais artrópodes envolvidos nessa disseminação (Jongejan e Uilemberg, 2004; Melo et al., 2016; Mahachi et al., 2020). O carrapato marrom *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) é o ixodídeo mais amplamente distribuído no mundo, prevalecendo ao longo do ano em áreas tropicais e subtropicais, tendo o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) como hospedeiro natural e preferencial (Galay et al, 2018). Dessa forma, o cão tem um importante papel na epidemiologia dessas doenças, tendo em vista o aumento da prevalência de doenças zoonóticas transmitidas por vetores no mundo (Han et al., 2016; Licari et al., 2017).

Os cães são susceptíveis à infecção por vários agentes transmitidos por ixodídeos, os quais carregam e transmitem grande variedade de vírus, bactérias e protozoários (Zhang et al., 2017; Qiu et al., 2018), como os protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, e bactérias como *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, hemoparasitos frequentemente encontrados nesses animais no Brasil (Dantas-Torres e Otranto, 2014; Malheiros et al., 2016; Sousa et al., 2017; Vieira et al., 2018).

As hemoparasitoses em cães constituem-se de enfermidades causadas por parasitos intracelulares de células sanguíneas, tais como as hemácias, plaquetas, leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) e/ou neutrófilos (Silva et al., 2014; Leal et al., 2015), e causam importantes alterações clínicas nos animais acometidos por esses patógenos (Soares et al., 2017). Essas doenças representam um desafio diagnóstico importante na clínica médica veterinária, pois os sinais clínicos induzidos por diferentes microrganismos podem ser semelhantes, podendo ainda serem agravados em situações de coinfeção, reduzindo a eficácia do tratamento e prejudicando o prognóstico (Rucksak et al., 2019; Guimarães et al., 2021).

O diagnóstico dessas doenças deve basear-se no histórico de exposição a carrapatos, achados clínicos e hematológicos compatíveis e a confirmação laboratorial, por meio de testes citológicos, sorológicos e moleculares (Otranto et al., 2010; Santarém e Aguiar, 2016; Guimarães et al., 2021). Os métodos de diagnóstico mais comumente utilizados na rotina clínica incluem o esfregaço sanguíneo, que apresenta limitações quanto a baixa sensibilidade e necessidade de um profissional experiente (Chomel, 2011; Kaewkong et al., 2014) e os testes

sorológicos rápidos, que não diferenciam infecção ativa e prévia exposição, podendo gerar resultados falso-negativos e falso-positivos (Aktas et al., 2015).

As técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por outro lado, vêm se tornando o método de eleição para a detecção de hemoparasitos em vertebrados e carrapatos (Kaewkong et al., 2014; Aktas et al., 2015; Santarém e Aguiar, 2016; Dagnone e Costa, 2018), por possuírem uma alta sensibilidade e especificidade em comparação a outros métodos convencionais de diagnóstico (Lew et al., 2002; Silva et al., 2021).

O risco de infecção por hemoparasitas e a gravidade dos sinais clínicos depende de uma complexa inter-relação entre o agente infeccioso, o vetor artrópode e a resposta imune do cão (Movilla et al., 2017). Diante disso, vários estudos no Brasil evidenciaram a presença de cães infectados por patógenos transmitidos por carrapatos (Dantas-Torres et al., 2012; Braga et al., 2013; Bernardino et al., 2016; Gomes et al., 2016; Soares et al., 2017; Sousa et al., 2017; Braga et al., 2019; Guimarães et al., 2021; Fonsêca et al., 2022), no entanto, ainda se observa uma escassez de dados sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos das doenças transmitidas por carrapatos no Nordeste do Brasil, mesmo diante da presença dos hemoparasitos e de condições climáticas favoráveis ao vetor (Rotondano et al., 2017; Lopes et al., 2018; Souza et al., 2018).

O município de Mossoró, localizado no estado do Rio Grande do Norte, possui clima semiárido, tipo Aw', segundo a classificação climática de W. Köppen, caracterizado por um clima tropical chuvoso com inverno seco e estação chuvosa no verão (Lemos Filho; Espínola; Oliveira Júnior, 2021), fornecendo características climáticas favoráveis a distribuição de ixodídeos adaptados a ambientes menos dependente de umidade para a sobrevivência, como o *R. sanguineus* s.l (Guimarães et al., 2011; Tanikawa et al., 2013). Segundo Gaunt et al. (2010), infestações por *R. sanguineus* s.l tem sido considerada um importante fator de risco para a infecção por *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis*, e *H. canis*.

Trabalhos desenvolvidos por este grupo de pesquisa evidenciam a presença desses agentes na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, utilizando a PCR como método de diagnóstico. Dados ainda não publicados mostraram uma prevalência de 13,3% (16/120) para *E. canis*, seguido de 11,7% (14/120) para *A. platys*, 5% (6/120) para *H. canis* e 5% (6/120) para *B. vogeli* em população de animais hígidos, dos quais sete cães apresentavam-se coinfectados por pelo menos dois hemoparasitos. Em animais de população hospitalar, sob qualquer suspeita clínica, foi observada prevalência de 20% (5/25) para *E. canis*, seguido de 8% (2/25) para *H. canis* e 4% (1/25) para *B. vogeli*, com presença de coinfecção por *E. canis* e *B. vogeli* em um cão.

Esses dados ressaltam a importância de estudos mais amplos em animais com sinais clínicos sugestivos da doença, principalmente devido a uma escassez de publicações que abordem os aspectos clinicopatológicos envolvidos em coinfeções e multi-infecções, tendo em vista que a associação desses patógenos podem ser responsáveis por potencializar a doença clínica, dificultar o diagnóstico e a instituição de tratamento adequado (Lara et al., 2020). Pesquisas dessa natureza permitirão determinar a ocorrência e caracterizar molecularmente esses patógenos na região semiárida potiguar, bem como conhecer o perfil clínico-epidemiológico dos cães infectados por um ou múltiplos patógenos transmitidos por carrapatos, contribuindo para a compreensão da dinâmica das doenças na região e fornecendo subsídios que possibilitam auxiliar no diagnóstico e, consequentemente, na instituição de medidas de tratamento, controle e prevenção adequadas às mesmas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES IXODÍDEOS EM CÃES

Dentre os artrópodes hematófagos, os carrapatos se destacam pelo elevado potencial de transmissão de agentes patogênicos (Jongejan e Uilemberg, 2004; Brito et al., 2006; Fuente et al., 2015). Por permanecerem por um longo período no ambiente e possuírem uma grande longevidade, são importantes vetores e reservatórios de agentes infecciosos (Labuda e Nuttal, 2004).

Dependendo do microrganismo, o patógeno pode persistir por muito tempo nos ixodídeos, já que a transmissão pode ocorrer de estágio para estágio, de fêmeas para ovos e/ou de carrapato para carrapato via hospedeiro (Boulanger et al., 2019). Além disto, possuem diversas substâncias em sua saliva com ação farmacológica (coagulação e inibição da dor), mas também com potencial imunorregulatório, que modula as atividades de citocinas nos hospedeiros, favorecendo a inoculação e transmissão de patógenos (Peterková et al., 2008; Bonnet e Boulanger, 2017).

Segundo Labruna e Pereira (2001) e Labruna et al. (2005), os carrapatos em cães no Brasil estão intimamente relacionados ao ambiente onde o hospedeiro vive, ocorrendo em dois cenários distintos, o urbano, onde predominam carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l., e o de áreas rurais ou suburbanas, com predominância de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, pelos quais os cães são acidentalmente parasitados ao invadir áreas de matas.

Alguns ectoparasitos são estritamente associados aos cães, como é o caso do carrapato *R. sanguineus* s.l., que tem o cão como hospedeiro de importância primária para a manutenção de sua população no ambiente (Dantas-Torres, 2007; Galay et al, 2018). O *R. sanguineus* s.l. pode ser encontrado infestando cães em todas as regiões brasileiras, no entanto, sua distribuição e prevalência podem variar a depender das condições climáticas e do grau de urbanização de cada área (Bulla et al., 2004; Dantas-Torres e Otranto, 2014; Guimarães et al., 2021; Fonsêca et al., 2022).

No território brasileiro, os principais patógenos transmitidos por carrapatos descritos em cães são *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis* (Dantas-Torres e Otranto, 2014; Malheiros et al., 2016), sendo responsáveis por diversas manifestações clínicas, anemia, trombocitopenia e leucopenia nos hospedeiros infectados, podendo em quadros clínicos mais severos levar a óbito (Labarthe et al., 2003; Spolidorio et al., 2011; Bernardino et al., 2016; Bouzouraa et al., 2017).

2.2 ERLIQUIOSE CANINA

2.2.1 Etiologia e epidemiologia

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, pertencente ao gênero *Ehrlichia*, ordem Rickettsiales e à família *Anaplasmataceae* (Dumler et al., 2001). É uma bactéria Gram-negativa que infecta primariamente células mononucleares maduras e imaturas, mede de 0,2-0,4 µm de diâmetro, intracelular obrigatória altamente pleomórfica (Dumler et al., 2001; COHN, 2003) e envolvida por uma fina membrana externa rugosa, além de possuir apenas um cromossomo, circular, contendo 1.315.030 nucleotídeos (Mavromatis et al., 2006).

Ao incorporar informações de biologia molecular referentes aos genes 16S rRNA e groESL, o gênero *Ehrlichia* foi reorganizado, agora albergando as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium* (Dumler et al., 2001; Shibata et al., 2000) e *E. minasensis* (Cabezas-Cruz et al., 2016), sendo a *E. canis* o agente etiológico da erliquiose monocítica canina; *E. chaffeensis*, agente etiológico da erliquiose monocítica humana; *E. ewingii* causadora da erliquiose granulocítica em cães e humanos; e *E. ruminantium*, que causa a doença do coração d'água em ruminantes, cães e humanos (Little, 2010).

No Brasil, a *E. canis* foi identificada pela primeira vez em 1973 (Costa et al. 1973), sendo a espécie mais comum no país desde então, estando presente em quase todas as regiões (Nakaghi et al., 2008; Dagnone et al., 2009; Vieira et al., 2011; Sousa et al., 2013; Melo et al., 2016; Reis e Pinto, 2017; Guimarães et al., 2021; Fonsêca et al., 2022). No entanto, já foram descritas outras espécies, como a *E. ewingii* acometendo cães no estado de Minas Gerais (Oliveira et al., 2009) e *E. chaffeensis* acometendo um veado pantaneiro no estado de São Paulo (Machado et al., 2006).

Embora a erliquiose monocítica canina seja descrita atualmente em todo o país, os dados de prevalência variam a depender das características da região, da presença e competência do vetor (Moraes-Filho et al., 2015). No Brasil, há duas populações de *R. sanguineus* filogeneticamente distintas, a cepa tropical com maior competência para transmitir a *E. canis*, e a cepa temperada, que possui menor competência de transmissão (Moraes-Filho et al., 2011; Parpinelli et al., 2017), além de diferentes condições climáticas e grau de urbanização que influenciam na distribuição do vetor e consequentemente na prevalência da doença (Dantas-Torres e Otranto, 2014).

No Sul do Brasil a positividade para *E. canis* utilizando métodos sorológicos variou de 1,7% a 42,4% (Labarthe et al., 2003; Trapp et al., 2006; Saito et al., 2008; Vieira et al., 2013). A baixa ocorrência em alguns estudos pode estar relacionada ao fato de possuírem em seu território o carrapato de baixa competência de transmissão, além do clima temperado, que influencia na distribuição e ocorrência do vetor (Parpinelli et al., 2017; Mongrue et al., 2018).

O agente é relatado na região Sudeste (Macieira et al., 2005; Ueno et al. 2009; Faria et al., 2010; Bittencourt et al., 2022); Centro-Oeste (Santos et al., 2009; Melo et al., 2011; Makino et al., 2016), Norte e Nordeste (Carvalho et al., 2008; Ramos et al. 2009; Carlos et al., 2011; Brandão et al., 2019; Guimarães et al., 2021; Pacheco et al., 2021; Fonsêca et al., 2022), com a ocorrência variando a depender da população estudada, local e método de diagnóstico, conforme observado no Quadro 1.

Quadro 1. Registros da ocorrência de erliquiose canina em cães domésticos no Brasil.

População analisada	Local	Frequência	Método de diagnóstico	Referências
Sul				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul	1,7%	ELISA ¹	Labarthe et al. (2003)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Londrina/PR	23%	ELISA	Trapp et al. (2006)
Cães domiciliados	Rio Grande do Sul	4,8%	RIFI ²	Saito et al. (2008)
Cães domiciliados	Alvorada do Sul/PR	42,4%	RIFI	Vieira et al. (2013)
Sudeste				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Rio de Janeiro/RJ	35,6%	PCR ³	Macieira et al. (2005)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Botucatu/SP	40%	PCR	Ueno et al. (2009)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Jaboticabal/SP	75%	PCR	Faria et al. (2010)
		82,5%	RIFI	
Cães domiciliados	Vila Velha e Anchieta/ES	0%	Esfregaço sanguíneo	Bittencourt et al. (2022)
		1,54%	PCR	
		90,77%	Teste rápido ImmunoComb®	
Centro-Oeste				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Ribeirão Preto/SP	38.9%	PCR	Santos et al. (2009)
Cães domiciliados	Poconé/MT	70,9%	RIFI	Melo et al. (2011)
Cães domiciliados	Várzea Grande /MT	76,3%	PCR	Makino et al. (2016)
Nordeste				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Ilhéus e Itabuna/BA	7,8%	PCR	Carvalho et al. (2008)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Recife/PE	9%	Esfregaço sanguíneo	Ramos et al. (2009)
		57%	PCR	
Cães domiciliados (população hospitalar)	Teresina/PI	4,44%	Esfregaço sanguíneo	Silva (2010)
		29,63%	PCR	
Cães domiciliados (população hospitalar)	Ilhéus/BA	5,5%	Esfregaço sanguíneo	Carlos et al. (2011)
		11%	PCR	
		36%	Dot-ELISA	

Cães domiciliados	Vila de Jericoacoara/CE	13,7%	PCR	Fonsêca et al. (2022)
Norte				
Cães domiciliados	Belém/PA	39,4%	PCR	Brandão et al. (2019)
Cães domiciliados	Ji-Paraná/RO	22,03%	PCR	Pacheco et al. (2021)
		24,29%	RIFI	

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹Ensaio imunoenzimático; ²Imunofluorescência indireta; ³Reação em Cadeia da Polimerase.

A EMC pode acometer cães de qualquer idade, sexo e raça (Harrus et al., 1997), no entanto, é encontrada mais comumente em animais de até um ano (COHN, 2003), e raças como Pastor Alemão (Harrus et al., 1997; Tilley et al., 2003), Dobermans e Pinchers demonstram maior susceptibilidade à doença (Tilley et al., 2003).

2.2.2 Patogenia e sinais clínicos

A EMC é uma doença infecciosa multissistêmica, de sintomatologia complexa e alta morbidade, com letalidade variável a depender da fase clínica em que se encontra (Kakoma et al., 2000).

A contaminação do cão sadio ocorre quando o carrapato infectado realiza o repasto sanguíneo, onde o mesmo deve permanecer fixado no animal por pelo menos oito horas, fazendo com que a sua temperatura eleve e ocorra a reativação da bactéria (Bremer et al., 2005).

A patogenia da doença envolve um período de incubação que pode variar de oito a 20 dias (Zhang et al., 2017; Thomson et al., 2018). Na corrente sanguínea do animal, o agente invade as células mononucleares no formato de corpúsculos elementares e, uma vez dentro da célula hospedeira, inibe a fusão fagolisossomal, agindo como mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro (Santarém e Aguiar, 2018). Além disso, multiplicam-se por fissão binária formando os corpúsculos iniciais e as mórulas (Aguiar, 2015; Reis e Pinto, 2017). Após 12 a 18 dias, a mórula se dissocia em corpúsculos elementares, que iniciam o processo de saída da célula por projeções da membrana citoplasmática ou ruptura da célula, deixando-as para parasitar outras (Aguiar, 2015).

A fase aguda da infecção causada pela *E. canis* pode durar de duas a quatro semanas, tempo em que ocorre a multiplicação da bactéria dentro das células do sistema mononuclear e disseminação do microrganismo no hospedeiro (Saito e Walker, 2016). A bactéria se multiplica nas células mononucleares circulantes e tende a se estabelecer em maior quantidade em órgãos em que predominam células do tecido mononuclear fagocitário, como fígado, baço e

linfonodos, causando linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular com consequente inflamação (Cohn, 2003; Zhang et al., 2017; Thomson et al., 2018).

Os monócitos infectados são transportados pelo sangue para outros órgãos do corpo, especialmente pulmões, rins e meninges, e aderem-se ao endotélio vascular, induzindo vasculite, infecção tecidual subendotelial, anemia e supressão da produção eritrocitária (Silva et al., 2016; Malik et al., 2018; Mcfee., 2018; Thomson et al., 2018).

As principais manifestações da doença na fase aguda incluem letargia, depressão, anorexia, anemia, vasculite, febre, perda de peso, vômito, diarreia, desidratação e uveíte, bem como esplenomegalia, linfadenomegalia, hepatomegalia e predisposição a hemorragias que variam desde a formação de petéquias até epistaxe (Castro et al., 2004; Malik et al., 2018; Mongruel et al., 2018).

Após a fase aguda, o organismo do cão imunocompetente pode eliminar a infecção ou prosseguir para a fase subclínica, podendo durar meses a anos, até manifestarem sintomas da doença crônica (Harrus et al., 1998; Malik et al., 2018; Thomson et al., 2018). Durante a fase subclínica, há elevada titulação de anticorpos para *E. canis* e geralmente os animais infectados não apresentam sinais clínicos (Iqbal e Rikihisa, 1994; Harrus et al., 2004).

Os casos crônicos da doença podem ocorrer meses ou anos após a infecção, com os sinais da fase aguda reaparecendo, mas com maior gravidade, podendo levar o animal a óbito (Aguiar, 2015). Além dos sinais clínicos da fase aguda, é possível o aparecimento de mialgia, sangramentos, lesões oculares, insuficiência renal, poliartrite e anormalidades neurológicas, sendo essa fase caracterizada pela supressão medular e alta letalidade, podendo ocorrer pancitopenia (Harrus et al., 1997; Dagnone et al., 2001; Little, 2010).

2.2.3 Diagnóstico

Com o intuito de aumentar a confiabilidade, o diagnóstico da EMC pode ser realizado associando as alterações clínicas e laboratoriais com testes de diagnóstico sorológicos e moleculares, além das alterações macroscópicas à necropsia e histopatologia em animais que vieram a óbitos pela doença (Dagnone et al., 2003; Alves et al., 2005; Nakaghi et al., 2008).

Na fase aguda da doença o animal apresenta trombocitopenia devido a destruição periférica de plaquetas, redução da meia vida plaquetária e produção de anticorpos contra as mesmas, além de leucopenia e discreta anemia normocítica normocrômica regenerativa (Bulla et al., 2004). Na fase subclínica, observa-se trombocitopenia persistente, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos (Waner et al., 1997). Já na fase crônica, caracterizada como

mielossupressora, destaca-se a anemia arregenerativa, trombocitopenia, leucopenia, linfocitose, plasmocitose esplênica e de medula óssea (Borin et al., 2009; Gianopoulos et al., 2016; Petrov et al., 2018).

Por ser uma técnica simples e barata, a identificação direta do agente através de citologia é comumente utilizada na rotina clínica para a visualização de mórulas em monócitos no esfregaço sanguíneo, ou em macrófagos, em caso de aspirados de tecidos (Silva et al., 2012). No entanto, esse método tem baixa sensibilidade e especificidade diagnóstica, principalmente da fase subclínica e crônica da doença, sendo recomendado a associação com outros métodos de diagnóstico (Castro et al. 2004; Moreira et al. 2005; Silva et al., 2012).

O teste padrão-ouro para o diagnóstico da EMC é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que detecta anticorpos IgG anti-*E. canis*, indicando a exposição ao agente (Mcbride et al., 2003). Outros testes como ELISA e Dot-blot-ELISA também estão sendo bastante utilizados como uma ferramenta de diagnóstico pelos médicos veterinários na rotina clínica (Lara et al., 2020), no entanto, é importante que os testes sorológicos sejam interpretados concomitantemente com os achados clínicos e as alterações laboratoriais, pois em áreas endêmicas e em casos crônicos, os títulos de anticorpos não condizem com a doença, acarretando um aumento no número de resultados falsos-positivos (Bulla et al., 2004).

Diante disso, resultados positivos em testes sorológicos indiretos apenas confirmam exposição ao agente, em contrapartida, resultados positivos em métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) confirmam a infecção (Cicuttin et al., 2016).

A PCR é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e especificidade, detectando o agente antes da soroconversão e formação das mórulas (Cicuttin et al., 2016; Santarém e Aguiar, 2018). Desta forma, diversos são os trabalhos que utilizam esta ferramenta para diagnóstico e tipificação molecular, contribuindo significativamente para o conhecimento genético da *E. canis* (Iqbal e Rikihisa, 1994; Doyle et al., 2005; Baneth et al., 2008; Zhang et al., 2008; Chen et al., 2010; Reis e Pinto, 2017; Guimarães et al., 2021; Fonsêca et al., 2022).

2.3 ANAPLASMOSE TROMBOCÍTICA CANINA

2.3.1 Etiologia e epidemiologia

A anaplasmoze canina é uma doença infecciosa causada por uma bactéria pertencente ao gênero *Anaplasma*, ordem Rickettsiales e família *Anaplasmataceae*, possuindo pelo menos seis espécies com diferentes hospedeiros (Silaghi et al., 2017). Dentre as principais espécies

que acometem cães, podemos destacar a *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*, sendo a *A. phagocytophilum* causadora da Anaplasmoose Granulocítica Canina, transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* spp., e *A. platys* causadora da Anaplasmoose Trombocítica Canina (ATC), transmitida pelo carrapato *R. sanguineus* s.l. (Little, 2010; Pennisi et al., 2017).

A prevalência da ATC varia a depender das condições climáticas da região e da distribuição do vetor, além das práticas de manejo e habitat dos animais (Berrada, 2009; Rodriguez-Vivas et al., 2016).

A anaplasmoose foi relatada pela primeira vez na década de 90, e com o passar dos anos, houve um aumento no número de casos no mundo todo (Harrus e Waner, 2011; Leal et al., 2015; Mcfee, 2018), sendo observada uma maior incidência em áreas tropicais e subtropicais, como a América do Sul (Chomel, 2011).

No Brasil, o *A. platys* é um dos principais patógenos transmitidos por carrapatos, sendo descrito em várias regiões do país, com prevalência variando entre 8% e 90,2% (Ferreira et al., 2007; Dagnone et al., 2009; Silva et al., 2012; Witter et al., 2013; Krause et al., 2016; Ribeiro et al., 2017; Brandão et al., 2019; Paschoal et al., 2020; Guimarães et al., 2021), conforme observado no Quadro 2.

Quadro 2. Registros da ocorrência de *A. platys* em cães domésticos no Brasil.

População analisada	Local	Frequência	Método de diagnóstico	Referências
Cães errantes	Rio de Janeiro/RJ	14,85%	Esfregaço sanguíneo	Ferreira et al. (2007)
		18,81%	PCR ¹	
Cães domiciliados (população hospitalar)	Jaboticabal e Campo Grande/SP	90,2%	PCR	Dagnone et al. (2009)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Teresina/PI	2,22%	Esfregaço sanguíneo	Silva (2010)
		41,48%	PCR ¹	
Cães domiciliados	Jataizinho/PR	19,4%	PCR	Silva et al. (2012)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Cuiabá/MT	9,1%	PCR	Witter et al. (2013)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Pelotas/RS	1,1%	Esfregaço sanguíneo	Krause et al. (2016)
		7,9%	PCR	
Cães errantes	Pato Branco/PR	32,9%	PCR	Ribeiro et al. (2017)
Cães errantes e domiciliados	Belém/PA	23,1%	PCR	Brandão et al. (2019)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Londrina/PR	15,1%	PCR	Paschoal et al. (2020)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Belém/PA	8%	PCR	Guimarães et al. (2021)

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹Reação em Cadeia da Polimerase

Não há relatos de predisposição de raça, sexo ou idade para infecções por *A. platys* (Baneth, 2010; Vieira et al., 2011; Sainz et al., 2015; Mcfee, 2018).

2.3.2 Patogenia e sinais clínicos

A transmissão da *A. platys* ocorre quando carrapatos infectados se alimentam de um hospedeiro suscetível, transmitindo a bactéria por meio de suas secreções salivares, podendo ocorrer também por transfusão sanguínea (Little, 2010). No vetor, a transmissão é transestadial, sendo capaz de inocular o agente em todas as suas fases de desenvolvimento (Silaghi et al., 2017; Dantas-Torres et al., 2018).

Após ser inoculado, o agente penetra as plaquetas pela sua aderência à superfície plaquetária, seguida de endocitose e multiplicação por divisão binária no interior dessas células,

dando origem a uma variedade de inclusões citoplasmáticas e mórulas, com posterior ruptura da célula que permite a disseminação da bactéria (Silaghi et al., 2017).

O período de incubação da anaplasmosse em cães é de oito a 15 dias (Machado et al., 2010). Durante a fase aguda da doença observa-se uma trombocitopenia cíclica devido a replicação desse agente com conseguinte ruptura celular e, conforme a doença vai entrando na sua fase crônica, casos esporádicos de trombocitopenia leve a moderada podem ser relatados (Machado et al., 2010; Dyachenko et al., 2012).

A. platys é considerado um agente menos patogênico em comparação a *A. phagocytophilum*, que causa imunossupressão, facilitando a sua multiplicação pelo sistema imune do hospedeiro e permitindo a entrada de agentes oportunistas (Santos et al., 2013; Jahfari et al. 2014).

A sintomatologia da ATC varia de acordo com a gravidade da doença, a resposta imune do hospedeiro e a presença de coinfeção com outros microrganismos transmitidos pelo mesmo vetor (Machado et al., 2010). Os sinais clínicos mais frequentemente observados costumam ser sinais inespecíficos como febre, letargia, inapetência ou anorexia, perda de peso, diarreia, náusea, vômito e dor abdominal (Kaewkong et al., 2014). Outros sinais clínicos incluem poliúria, polidipsia, sinais respiratórios, mucosas pálidas, distúrbios hemorrágicos, uveíte, congestão escleral e sinais neurológicos (Granick et al., 2009; Mazepa et al., 2010; Eberts et al., 2011; Chirek et al., 2018).

2.3.3 Diagnóstico

Para o diagnóstico da anaplasmosse canina, assim como para outras hemoparasitoses, recomenda-se a associação dos achados clínico-epidemiológicos e alterações laboratoriais com testes de diagnóstico sorológicos e moleculares (Leal et al., 2015; Kaewmongkol et al., 2017).

As principais alterações laboratoriais encontradas incluem episódios de trombocitopenia cíclica, anemia normocítica leve a moderada não regenerativa, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (Tateishi et al., 2015; Kottadamane et al., 2017), além de neutropenia (Tommasi et al., 2014; Leal et al., 2015; Kaewmongkol et al., 2017).

A pesquisa de mórulas do agente no interior de plaquetas por meio do esfregaço sanguíneo se apresenta como um teste diagnóstico rápido e barato, no entanto, possui baixa especificidade e sensibilidade, além de ser eficiente apenas quando o animal se encontra na fase aguda da doença (Ueno et al., 2009; Leal et al., 2015; Silaghi et al., 2017; Liu et al., 2017).

Métodos sorológicos são bastante solicitados na rotina clínica, tais como a RIFI e o ELISA, no entanto, essas técnicas não distinguem a infecção atual de uma exposição prévia, além de possuírem alta sensibilidade e baixa especificidade, determinando os níveis de anticorpos, mas não diferenciando a espécie (*A. platys* ou *A. phagocytophilum*) (Gianopoulos et al., 2016; Liu et al., 2017).

Diante dessas limitações, os métodos moleculares de diagnósticos, como a PCR, se mostram como uma excelente alternativa, por possuírem uma alta sensibilidade e especificidade em comparação aos outros métodos de diagnóstico convencionais, proporcionando a detecção direta do material genético de *A. platys* (Silaghi et al., 2017).

2.4 BABESIOSE CANINA

2.4.1 Etiologia e epidemiologia

A babesiose é uma doença parasitária que tem como agente etiológico um hemoprotozoário do gênero *Babesia*, família *Babesiidae*, ordem *Piroplasmida* e Filo *Apicomplexa* (Yabsley et al., 2008; Irwin, 2009). Dentre as principais espécies de babesia que acometem cães, podemos destacar a *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi* e *Babesia gibsoni* (Silva et al., 2014).

B. vogeli é transmitida por *R. sanguineus* s.l. em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo; *B. canis* é transmitida pelo ixodídeo *Dermacentor reticulatus* na Europa e na Ásia (Solano-Gallego et al., 2016); *B. rossi* por *Haemophysalis elliptica* na África (Collett, 2000) e *B. gibsoni* pelos carrapatos *R. sanguineus* s.l., *Haemaphysalis bispinosa* e *Haemaphysalis longicornis* na Ásia, América do Norte, Austrália, América do Sul e Europa (Solano-Gallego et al., 2016).

No Brasil já foram relatadas duas espécies de babesia, *B. vogeli* e *B. gibsoni* (Trapp et al., 2006). A doença é considerada endêmica, com sua ocorrência variando de região para região a depender da distribuição do seu principal vetor no país, o *R. sanguineus* s.l., principalmente em áreas urbanas e periféricas (Dantas-Torres; Figueiredo, 2006; Spolidorio et al., 2011; Silva et al., 2014; DIAS E FERREIRA, 2016), sendo *B. vogeli* a principal espécie relatada (Braga e Silva, 2013).

Babesia vogeli foi relatada em cães no Brasil pela primeira vez em 2005 (Passos et al., 2005) e desde então vários estudos foram realizados para determinar a ocorrência da babesiose canina no país, sendo alguns destes resumidos no Quadro 3.

Quadro 3. Registros da ocorrência da babesiose canina em cães domésticos no Brasil.

População analisada	Local	Frequência	Método de diagnóstico	Referências
Cães domiciliados (população hospitalar)	Londrina/PR	36%	RIFI ¹	Trapp et al. (2006)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Cuiabá/MT	60%	PCR ²	Spolidorio et al. (2011)
Cães errantes	Campo Grande/MS	3,3%	PCR	Sousa et al. (2013)
		81,6%	RIFI	
Cães domiciliados	Abadia dos Dourados /MG	20,8%	Esfregaço sanguíneo	Silva et al. (2014)
Cães domiciliados	Chapadinha/MA	0,9%	PCR	Costa et al. (2015)
		16,1%	RIFI	
Cães domiciliados (população hospitalar)	Patos/ PB	2%	Esfregaço sanguíneo	Rotondano et al. (2015)
		10%	PCR	
Cães domiciliados (população hospitalar)	São Luís/MA	0%	Esfregaço sanguíneo	Galeno et al. (2018)
		7,69%	PCR	
Cães domiciliados (população hospitalar)	Teresina/PI	2,2%	Esfregaço sanguíneo	Braga et al. (2019)
		4,8%	PCR	
		48,6%	RIFI	
Cães domiciliados (população hospitalar)	Cuiabá/MT	0,3%	Esfregaço sanguíneo	Pereira et al. (2021)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Fortaleza/CE	0,19%	Esfregaço sanguíneo	Veloso et al. (2021)
Cães errantes	Montes Claros/MG	0%	Esfregaço sanguíneo	Vieira et al. (2021)
		46,2%	PCR	
Cães domiciliados	Vila Velha e Anchieta/ES	0%	Esfregaço sanguíneo	Bittencourt et al. (2022)
		4,62%	PCR	
Cães domiciliados	Vila de Jericoacoara/CE	15%	PCR	Fonsêca et al. (2022)

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹Imunofluorescência indireta; ²Reação em Cadeia da Polimerase

Alguns estudos relatam que não há predisposição por sexo, idade ou raça (Ribeiro et al., 1990; Costa-Júnior et al., 2009), no entanto, trabalhos como o de Benigno et al. (2011) relataram que animais de raça definida apresentaram maior predisposição para desenvolver a infecção. Sabe-se também que filhotes e idosos possuem menor imunidade, desta forma, têm maior

predisposição para certas infecções (Rotondano et al., 2015; Paulino et al., 2018), o que foi observado por Fonsêca et al. (2022), que identificou associação entre a idade do animal e positividade para *B. vogeli*, onde os cães menores de três anos foram os mais susceptíveis.

2.4.2 Patogenia e sinais clínicos

O cão se infecta principalmente pela picada do carrapato que possui o parasita em sua saliva, no entanto, o animal pode se infectar por outros meios, como transfusão sanguínea e feridas provenientes de brigas com outros cães (Jefferies et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2016; Jalovecka et al., 2018), além da transmissão via placentária (Cardoso et al., 2010; Jefferies et al., 2007).

No carrapato vetor a transmissão pode ocorrer de duas formas, transovariana e salivar (Chauvin et al., 2009). No repasto sanguíneo, após o carrapato ingerir os eritrócitos do hospedeiro contaminados com o parasita na fase de merozoítos, o protozoário se reproduz sexualmente no lúmen intestinal do vetor, originando a esporogônia, que se fixa no epitélio da parede intestinal e migra através da hemocele para outros órgãos do artrópode (Chauvin et al., 2009; Ribeiro et al., 2017), inclusive para o tecido das glândulas salivares contaminando as células com esporozoítos (Uilenberg, 2006).

Os esporozoítos presentes na saliva do carrapato são os responsáveis pela infecção, que se aderem às hemácias do hospedeiro e as invadem formando trofozoítos (Uilenberg, 2006). Os trofozoítos se dividem dentro dos eritrócitos por fissão binária, produzindo os merozoítos que provocam a lise da célula e a sua liberação na corrente sanguínea, infectando outros eritrócitos e provocando anemia hemolítica, decorrente da destruição direta dessas hemácias (Uilenberg, 2006; Dias e Ferreira, 2016).

O período de incubação entre a picada do carrapato e os primeiros sinais clínicos pode levar semanas, sendo resultado da destruição das hemácias pelo parasita (Lavan et al., 2018). A infecção pode ser subclínica, crônica sem sinais clínicos ou com sintomas discretos; ou de forma aguda, com sinais clínicos mais evidentes (Schnittger et al., 2012), sendo a forma subclínica a apresentação predominante no Brasil (Vidotto e Trapp, 2004).

A gravidade da doença pode variar a depender da idade, eficiência do sistema imunológico e da presença de coinfeções no animal (Schnittger et al., 2012), além da espécie de *Babesia* sp. envolvida na infecção e grau de multiplicação do agente (Taboada e Lobetti, 2006).

Os animais que possuem uma resposta humoral competente manifestam sinais clínicos típicos da doença branda, que incluem mucosas pálidas, febre, taquicardia, taquipnéia, esplenomegalia, icterícia, anorexia e depressão (Lobetti, 1998). Os casos mais graves incluem anemia, esplenomegalia, febre, letargia e mucosas pálidas, sendo que alguns podem apresentar icterícia, hepatopatia, desidratação, insuficiência renal aguda, perda de peso, síndrome da angústia respiratória aguda, sinais nervosos e lesões miocárdicas (Lobetti, 1998; Lobetti et al., 2002).

2.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico da babesiose canina é baseado na associação dos achados clínico-epidemiológicos com outros métodos de diagnóstico, como o diagnóstico citológico através do esfregaço sanguíneo de sangue periférico, testes sorológicos e testes moleculares (Schoeman, 2009).

O animal pode apresentar alterações laboratoriais como anemia regenerativa, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hemoglobinúria, acidose metabólica, azotemia, hipoalbuminemia e alterações leucocitárias (Solano-Gallego et al., 2016; Cota et al., 2018). Nos primeiros dias após a infecção, a anemia é normocítica normocrômica, e com a progressão da doença, se torna macrocítica, hipocrômica e regenerativa (Dias e Ferreira, 2016).

O diagnóstico através do esfregaço sanguíneo pode ser realizado pela visualização dos parasitas no interior dos eritrócitos ou livres no plasma, no entanto, essa técnica apresenta baixa sensibilidade (Silva et al., 2014; Cota et al., 2018), sendo mais útil na fase aguda da doença, quando o nível de parasitemia encontra-se alto (Dias e Ferreira, 2016; Gottlieb et al., 2016). Dessa forma, mesmo não visualizando o parasita no esfregaço, é possível que o cão tenha a doença (Little, 2010).

Testes sorológicos normalmente apresentam uma maior sensibilidade, porém com uma baixa especificidade, além de não distinguirem a infecção atual da anterior (Gottlieb et al., 2016). Exames mais sensíveis como a RIFI e o ELISA permitem identificar os níveis de anticorpos e estabelecer se estão altos ou baixos, no entanto, sem fornecer informações sobre o estágio da infecção (Araujo et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2016). Testes rápidos também vem sendo usados no diagnóstico da doença, mas podem gerar resultados falso-negativos e falso-positivos (Irwin, 2009; Baneth, 2011).

Por esses motivos, as técnicas moleculares, como a PCR, têm sido aplicadas, por se tratar de um método de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade, permitindo o

diagnóstico em infecções agudas, subclínicas ou crônicas mesmo nos casos de baixa parasitemia (Macintire et al., 2002). Outra vantagem na utilização da PCR é que várias espécies podem ser distinguidas através da técnica (Tayyub et al., 2019).

2.5 HEPATOZOONOSE CANINA

2.5.1 Etiologia e epidemiologia

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida, subordem Adeleorina e família *Hepatozoidae* (Levine et al., 1988; Mathew et al., 2000). As espécies *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* são os agentes causadores da doença em cães (Vincent-Johnson et al., 1997; Forlano et al., 2005), estando associados aos carrapatos *R. sanguineus* s.l. e *Amblyomma maculatum*, respectivamente (Barati e Razmi, 2018; Prakash et al., 2018).

Desde os primeiros relatos na Índia em 1905 (James, 1905), a doença vem sendo descrita em diferentes regiões do mundo, observando-se a presença do *H. canis* na Europa, África, Ásia e na América do Sul, enquanto *H. americanum* infecta cães nos Estados Unidos (Vincent-Johnson et al., 1997; Baneth e Shkap, 2003; Allen et al., 2011), no entanto, já foi identificado infectando cães no norte do Brasil (Gomes et al., 2016).

Assim como outras doenças transmitidas por vetores artrópodes, a prevalência da hepatozoonose canina está estritamente relacionada a presença e distribuição do carrapato vetor, descrita principalmente em regiões tropicais, subtropicais e de clima temperado (Baneth et al., 2003; Baneth, 2011). No Brasil, os carrapatos *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. são os principais vetores da doença (Baneth et al., 2003; Baneth, 2011; Dantas-Torres et al., 2012).

H. canis possui ampla distribuição no território nacional, sendo relatado na região nordeste (Ramos et al., 2010; Bernardino et al., 2016; Lopes et al., 2019; Fonsêca et al., 2022); norte (Gomes et al., 2016; Pacheco et al., 2021), sudeste (Mundim et al., 2008; Rubini et al., 2008; Polidório et al., 2009; Miranda et al., 2014; Vieira et al., 2018), centro-oeste (Ramos et al., 2015; Melo et al., 2016); e região sul (Malheiros et al., 2016; Mongrue et al., 2018), conforme evidenciado no Quadro 4.

Quadro 4. Registros da ocorrência de hepatozoonose canina em cães domésticos no Brasil.

População analisada	Local	Frequência	Método de diagnóstico	Referências
Nordeste				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Recife/PE	0,49%	PCR ¹	Ramos et al. (2010)
Cães domiciliados	Areia/PB	9,3%	Esfregaço sanguíneo	Bernardino et al. (2016)
Cães errantes	Natal/RN	10%	PCR	Lopes et al. (2019)
Cães domiciliados	Vila de Jericoacoara/CE	11,8%	PCR	Fonsêca et al. (2022)
Norte				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Belém/PA	5,07%	PCR	Gomes et al. (2016)
Cães domiciliados	Ji-Paraná/RO	48,02%	PCR	Pacheco et al. (2021)
Sudeste				
Cães domiciliados	Anápolis/GO	5,56%	Esfregaço sanguíneo	Mundim et al. (2008)
Cães domiciliados	Botucatu, Rio Claro e Presidente Prudente/SP	11,7%	Esfregaço sanguíneo	Rubini et al. (2008)
		53,3%	PCR	
Cães domiciliados	Espírito Santo	64,3%	PCR	Spolidorio et al. (2009)
Cães domiciliados	Uberlândia/MG	79,2%	PCR	Miranda et al. (2014)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Espírito Santo	10,31%	PCR	Vieira et al. (2018)
Centro-Oeste				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Campo Grande/MS	3,63%	PCR	Ramos et al. (2015)
Cães domiciliados	Poconé/MT	8,75%	PCR	Melo et al. (2016)
Sul				
Cães domiciliados (população hospitalar)	Passo Fundo/RS	1%	PCR	Malheiros et al. (2016)
Cães domiciliados (população hospitalar)	Guarapuava/PR	1,33%	PCR	Mongruel et al. (2018)

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹Reação em Cadeia da Polimerase

A hepatozoonose canina não apresenta predisposição por sexo, raça ou idade, sendo a infecção mais comum em cães de áreas rurais, provavelmente pelo maior contato do animal com o vetor e maiores chances de infestação pelo artrópode (O'dwyer e Massard, 2001; O'dwyer, 2011).

2.5.2 Patogenia e sinais clínicos

O carrapato se infecta ao ingerir sangue com presença de neutrófilos contendo gamontes do protozoário, onde se reproduz sexuadamente no intestino do carrapato, produzindo oocistos contendo esporozoítos infectantes (Forlano, 2005; O'dwyer, 2011; Hornok et al., 2013). A forma mais comum dos cães se infectarem é através da ingestão dos ixodídeos presentes nos pelos ou se alimentando de uma presa que esteja infestada de carrapatos contaminados (Baneth et al., 2003).

Após a ingestão do artrópode contendo o protozoário, os esporozoítos invadem as células mononucleares e disseminam-se pela via sanguínea e linfática para diferentes órgãos do hospedeiro vertebrado, alcançando o sistema porta, chegando ao fígado, pulmões, baço, medula óssea, rins e linfonodos, podendo causar hepatite, glomerulonefrite e pneumonia (Baneth et al. 1997; Baneth e Shkap, 2003; Forlano, 2005).

As manifestações clínicas apresentadas na hepatozoonose canina são variáveis a depender do nível de parasitemia, da idade do hospedeiro, resposta imune do mesmo e associação com outras doenças (Rubini et al., 2005), podendo se manifestar a partir do 16º dia de infecção (Aguiar, 2016). No entanto, é uma doença subclínica na maior parte dos casos, mas pode chegar a quadros brandos a graves em situações de baixa imunidade dos hospedeiros vertebrados, com parasitemia acentuada (Mundim et al., 2008; Baneth et al., 2003; Baneth, 2011).

Os sinais clínicos mais comumente observados são anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, febre, corrimento ocular, linfadenomegalia, poliúria e polidipsia, diarreia, vômito, degeneração muscular e atrofia, sendo a maioria dos sintomas inespecíficos (Mundim et al., 2008; Aguiar, 2016; Santos et al., 2018).

2.5.3 Diagnóstico

O diagnóstico da hepatozoonose canina pode ser realizado através da identificação de gamontes em esfregaços sanguíneos, exames histopatológicos, testes sorológicos e moleculares (Gonen et al., 2004).

As principais alterações hematológicas encontradas na hepatozoonose consistem em anemia normocítica normocrômica e leucocitose com neutrofilia, podendo apresentar uma leucocitose severa, com até 200.000 leucócitos/ μ L, com desvio a esquerda e ausência de neutrófilos tóxicos (Baneth et al., 2003; Paludo et al., 2003; O'dwyer et al. 2011).

O diagnóstico citológico, por meio da visualização de gamontes no interior de neutrófilos e monócitos no esfregaço sanguíneo, muitas vezes ocorre de forma casual na rotina

laboratorial em cães sem sinais clínicos (O'dwyer e Massard, 2001; Forlano et al., 2005; O'dwyer, 2011; Braga et al., 2020). Entretanto, apesar de prático, esse método de diagnóstico possui baixa sensibilidade, já que gamontes nem sempre são detectáveis, principalmente quando a parasitemia é baixa ou intermitente (O'dwyer e Massard, 2001). Diante disso, a ausência de parasitemia não indica ausência de infecção, sendo recomendado a associação com outros métodos de diagnóstico (Eiras et al., 2007).

A RIFI, *western blot* e biópsia tecidual têm sido usadas como técnicas alternativas no diagnóstico (Baneth et al., 1997), entretanto, tais métodos são laboriosos e demorados, além de possuírem baixa especificidade, sendo usadas principalmente em estudos epidemiológicos (Inokuma et al., 1999).

Por ser um teste mais sensível e específico, a reação em cadeia da polimerase tem sido usada frequentemente para o diagnóstico e estudos epidemiológicos de infecções por *H. canis* (Allen et al., 2011), tendo em vista que a PCR, em conjunto com a ferramenta de sequenciamento genético, nos permite conhecer a diversidade desse agente e fornece dados que nos ajudam a compreender o impacto deste em diferentes espécies de animais (Marques et al., 2022).

2.6 HEMOPARASITOSE DE CÃES E SAÚDE ÚNICA

A exposição de cães a doenças transmitidas por carrapatos em todo o mundo está associada ao aumento da atividade dos ixodídeos vetores em regiões com condições climáticas e ambientais favoráveis (Yabsley e Shock, 2013). A íntima relação do cão com o tutor, associada a uma elevada prevalência dos artrópodes, aumenta o risco de exposição do homem a zoonoses transmitidas por eles, ressaltando a importância que o cão possui na saúde única (Castro e Rafael, 2006; Day, 2011).

Neste contexto, de acordo com Diniz et al. (2007), os cães são considerados sentinelas para a determinação da prevalência da infecção de agentes transmitidos por carrapatos, além de servirem como reservatórios de tais doenças para o ambiente domiciliar (Greene e Breitschwerdt, 2006).

As zoonoses associadas a cães domésticos incluem várias doenças, como febre maculosa, babesiose e erliquiose (Kotton et al., 2010). Evidências sorológicas indicam que os humanos podem estar expostos ao risco de infecção por *E. canis* (Vieira et al., 2013), além do cão servir como portador assintomático de outros hemoparasitos frequentemente encontrados no Brasil, tais como *H. canis* e *B. vogeli* (Dias e Ferreira, 2016; Marques et al., 2022).

Dada a importância dos carrapatos na saúde única devido a sua participação na emergência e reemergência de diversas zoonoses (Dantas-Torres e Otranto, 2014), o controle vetorial se mostrou a única medida efetiva para a maioria das doenças transmitidas por vetores no Brasil (Dantas-Torres, 2008). É de suma importância que a adoção dessas medidas seja realizada com base na prevalência de cada espécie da região, com o intuito de estabelecer ações de controle e prevenção adequadas, otimizando os recursos e diminuindo o impacto ambiental (Torres et al., 2004; Zanella, 2016). A adoção de medidas de controle populacional de animais e programas educativos de guarda responsável também contribuem para o controle do vetor, já que acarretam um menor número de cães errantes expostos ao risco de ectoparasitismo e infestação ambiental por carrapatos, pulgas e piolhos (Andrade, 2011; Guimarães et al., 2011; Maggi e Kramer, 2019).

Cabe, no entanto, ressaltar que atualmente, as doenças transmitidas por carrapatos têm apresentado desafios para a saúde pública e veterinária devido a recidivas condicionais, seu modo de transmissão e o desenvolvimento frequente de resistência a acaricidas. Uma vez que não há uma solução única ideal para o controle de carrapatos, o passo mais eficaz é provavelmente uma abordagem de controle integrado, sendo necessária a colaboração de médicos veterinários, médicos e pesquisadores, seguindo a abordagem de *One health*, com ferramentas diagnósticas (Day, 2011). Ainda segundo Day (2011), as áreas de colaboração incluem amostragem de animais, carrapatos e humanos em diversas localizações, bem como detecção do patógeno por métodos moleculares e sorológicos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. Erliquioses. In: JERICÓ, M. M.; DE ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. v. 2, 1 ed. Rio de Janeiro: Roca. Cap. 83, p. 2329-2349, 2015.
- AGUIAR, D. M. et al. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 5, 537–544, 2014.
- AGUIAR, M. A. Hepatozoonose. In: MEGID, J, RIBEIRO, M. G, PAES, A. C. (Org.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, p. 1004-1008, 2016.
- AKTAS, M. et al. Molecular detection of tickborne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 157, 2015.
- ALLEN, K. E. et al. *Hepatozoon spp* infections in the United States. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 6, p. 1221-38, 2011.
- ALVES, L. M. et al. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.
- ARAUJO, A. C. et al. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 456-461, 2015.
- BANETH, G. et al. B. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. **Veterinary Parasitology**, v.70, p.201-206, 1997.
- BANETH, G. et al. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321-325, 2008.
- BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 3-11, 2011.
- BANETH, G.; SHKAP, V. Monozoic Cysts of *Hepatozoon canis*. **Journal of Parasitology**. V. 89, n. 2, p. 379–381, 2003.
- BARATI, A.; RAZMI, G. R. A. Parasitologic and Molecular Survey of *Hepatozoon canis* Infection in Stray Dogs in Northeastern Iran. **The Journal of Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 413-417, 2018.
- BARROS-BATTESTI, D. M. et al. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p.223, 2006.
- BENIGNO, R. N. M. et al. Avaliação das infecções por *Babesia* e *Ehrlichia* em cães e das infecções humanas por carrapatos oriundos desses cães no município de Campinas, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 4, p. 238-245, 2011.

- BERNARDINO, M. G. S. et al. Prevalência de hepatozoonose canina no município de Areia, Paraíba, Brasil. **Biotemas**, v. 29, n. 1, p. 175-179, 2016.
- BERRADA, L.; TELFORD, S. Burden of tick-borne infections on american companion animals. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 5, p. 175-182, 2009.
- BIRGEL, E.H. et al. **Patologia Clínica Veterinária** São Paulo, p. 177-213, 1982.
- BITTENCOURT, J. et al. A ocorrência de *Babesia* sp., *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães domiciliados, em dois municípios do Estado do Espírito Santo–Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1-9, 2022.
- BONNET, S., BOULANGER, N. Ixodes Tick Saliva: a potent controller at the skin Interface of early *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmission. In: **Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2**. Academic press, p.231- 248, 2017.
- BORIN, S. et al. 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.
- BOULANGER, N. et al. Ticks and tick-borne diseases. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 49, n. 2, p. 87-97, 2019.
- BOUZOURAA, T. et al. Implication, clinical and biological impact of vector-borne haemopathogens in anaemic dogs in France: a prospective study. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 9, p. 510-518, 2017.
- BRAGA, I. A. et al. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 470-474, 2013.
- BRAGA, J. F. V. et al. Molecular, serological, and parasitological detection of *Babesia vogeli* in dogs in the state of Piauí, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6Supl2, p. 3035-3044, 2019.
- BRAGA, J. F. V.; SILVA, S. M. M. S. Babesiose canina: uma visão geral da doença. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 2, p. 204-213, 2013.
- BRAGA, P. O. et al. Primeiro relato da ocorrência de *Hepatozoon* spp. no município de Santa Teresa, Espírito Santo. **Medicina veterinária e zootecnia**, v.14, n.8, p.1-6, 2020.
- BRANDÃO, V. M. D. et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, 2019.
- BREMER, W. G. et al. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.

BRITO, L.G. et al. Bio ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Porto Velho: Embrapa Rondônia, p.21, 2006.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet Res**, v. 35, p. 141146, 2004.

CABEZAS-CRUZ, A. et al. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1426-1430, 2016.

CARDOSO, L. et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **Vet J**, 183(2):232-3, 2010.

CARLOS, R. S. A. et al. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2011.

CARVALHO, F.S. et al. Epidemiological and molecular study of Ehrlichia canis in dogs in Bahia, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v.7, n.3, p.657-62, 2008.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. **Procedimientos para estudios de prevalência por muestreo**. Buenos Aires: Ramos Mejia, p. 39, 1979, (Nota Técnica 18).

CHAUVIN, A. et al. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v.40, p.37, 2009.

CHEN, Y. H.; LEE, C.C.; TSANG, C.L.; CHUNG, Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.70-75, 2010.

CHIREK, A. et al. Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. **Journal of Small Animal Practice**. v. 59, p. 112-20, 2018.

CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs - an emerging infectious threat. **Veterinary parasitology**, v. 179, n. 4, p. 294-301, 2011.

CICUTTIN, G.L. et al. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 5, p. 954-957, 2016.

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

COLLETT, M. G. Survey of canine babesiosis in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, n. 3, p. 180–186, set. 2000.

COSTA, A. P. et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 28–35, mar. 2015.

COSTA, J. O. S. E. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Esc. Vet UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v. 109, n. 3-4, p. 321-326, 2013.

COSTA-JÚNIOR, L.M. et al. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.257-260, 2009.

COTA, J. M. et al. *Babesia* spp. no líquido peritoneal em cão com ascite - relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1109-1114, 2018.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, ou tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.283-290, 2003.

DAGNONE, A. S. et al. 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.

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

DAGNONE. A. S. et al. *Anaplasma platys* (Anaplasmosse trombocitotrófica canina). In: DAGNONE, A. S; COSTA, M. T. (Org.). **Doenças infecciosas na rotina de cães e gatos no Brasil**. Curitiba: MedVep, p. 171-175, 2018.

DANTAS-TORRES, F. et al. *Ehrlichia* spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p.1-6, 2018.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **Lancet Infect Disease**, v. 7, p. 724-732, 2007.

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

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 22, 2014.

DAY, M. J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 1-6, 2011.

DIAS, V. A. C. M.; FERREIRA, F. L. A. Babesiose canina: Revisão. **Pubvet**, v. 10, n. 12, p. 886-888, 2016.

DINIZ, P.P.V.P. et al. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, n 4, p. 1-9, 2007.

DOYLE, C. K. et al. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p. 504-510, 2005.

DUARTE S.C. et al. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Veterinary Parasitology** 152:16-20, 2008.

DUBIE, T. R. et al. Pictorial key for identification of immature stages of common ixodid ticks found in pastures in Oklahoma. **Southwest Entomol**, 42(1): p.1-14, 2017.

DUMLER, J. S. et al. 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 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DYACHENKO, V. et al. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 49, 2012.

EBERTS, M. D. et al. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, p. 88-94, 2011.

EIRAS, D. F. et al. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Veterinary Parasitology**. n.149, p.275–279, 2007.

FARIA, J. L. et al. *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. et al. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. v.5, p.113-119, 2007.

- FONSECA, A. D. V. et al. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022.
- FORLANO, M. et al. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 1–7, 2005.
- FUENTE, J. et al. Prevention and control strategies for ticks and pathogen transmission. **Revue Scientifique et technique (International office of epizootics)**, n. 34, v. 1, p. 249-264, 2015.
- GALAY, R. L. et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in canine population and *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from southern Metro Manila and Laguna, Philippines. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 643, 2018.
- GALENO, L. S. et al. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães da cidade de São Luís–MA, Brasil. **PUBVET**, v. 12, p. 131, 2018.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005.
- GAUNT, S. et al. Experimental infection and coinfection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.
- GIANOPOULOS, A., et al. Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 2, p. 281-290, 2016.
- GOMES, L. A. et al. Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 1061-1066, 2016.
- GOMES, L. et al. Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 6, p. 1061-1066, 2016.
- GONEN, L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*, **Veterinary Parasitology**, n. 21; v.2, p. 131-139, 2004.
- GOTTLIEB, J. et al. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 172-178, 2016.
- GRANICK, J. L. et al. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000–2007). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 12, p. 1559 - 1565, 2009.

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

GUIMARÃES, A. M. et al. Ectofauna parasitária de cães urbanos domiciliados em clínicas veterinárias particulares na cidade de Lavras, MG. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.1, p.172-177, 2011.

GUIMARÃES, M. C. N. et al. Ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos em cães domésticos em Belém, Pará, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, n. 4 de 2021.

HAN, B. A. et al. Global patterns of zoonotic disease in mammals. **Trends Parasitol.** n.32, p.565–577, 2016.

HARRUS, S. et al. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2140-2, 1998.

HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Comp Cont Educ Pract**, v. 36, p. 431-47, 1997.

HARRUS, S. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4488–4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 292–296, 2011.

HORNOK, S. et al. High prevalence of Hepatozoon-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.196, p. 189-193, 2013.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. CECAV - Centro Nacional de Estudo, Proteção e Manejo de Cavernas. Núcleo do Rio Grande do Norte. Diagnóstico espeleológico do Rio Grande do Norte: caracterização geográfica do Rio Grande do Norte. Natal – RN: IBAMA, 2007. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/cecav>>. Acesso em 30 jun. 2022.

INOKUMA, H. et al. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. n.61, p.1153-1155, 1999.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 281–287, dez. 1994.

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

JAHFARI, S. et al. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 365-375, 2014.

JALOVECKA, M. et al. The Complexity of Piroplasms Life Cycles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 248, p. 1-12, 2018.

JAMES, S.P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Scientific Memoirs by officers of the Medical and Sanitary Department of the Government of India**, n.14, p.1-12. 1905.

JEFFERIES, R. et al. Babesia gibsoni: detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. **Experimental parasitology**, v. 117, n. 2, p. 115-123, 2007.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S3-14, 2004.

KAEWKONG, W. et al. High throughput pyrosequencing technology for molecular differential detection of *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in canine blood samples. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 4, p. 381-385, 2014.

KAEWMONGKOL, G. et al. Association of Ehrlichia canis, Hemotropic Mycoplasma spp. and Anaplasma platys and severe anemia in dogs in Thailand. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p.195-200, 2017.

KAKOMA, I. et al. Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis: towards a universal case definition. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, New York, v. 916, p. 396-403, 2000.

KAUR, N. et al. Development and application of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs. **Acta Tropica**, 212:105713, 2020.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**: Bioquímica Clínica e Hematologia. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 339-359, 2003.

KOTTADAMANE, M. R. et al. Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. **Veterinary World**, v. 10, n. 2, p. 255-261, 2017.

KOTTON, C.N. et al. Zoonoses from dogs. **UpToDate on line**, 2010. Disponível em: <http://www.uptodate.com/online>. Acessado em: 25 de junho de 2022.

KRAUSE, L. E. B. et al. Molecular characterization of *Anaplasma platys* in dogs in Pelotas city, Southern Brazil. **Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 20-25, 2016.

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

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: *Ixodidae*) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.

- LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães do Brasil. **Clinica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.
- LABUDA, M.; NUTTAL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, v. 129, p. 221-245, 2004.
- LANDIS, J.; KOCH, G. The measurement of observer agreement for categorical data, Washington, USA. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- LARA, B. et al. Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 488, 2020.
- LAVAN, R. et al. Canine babesiosis treatment rates in South African veterinary clinics between 2011 and 2016. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 386, p. 1-5, 2018.
- LEAL, P. D. S. et al. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 55-62, 2015.
- LEMOS FILHO, L. C. A. ESPÍNOLA SOBRINHO, J.; OLIVEIRA JÚNIOR., H. S. Clima e Recursos Hídricos na Bacia Hidrográfica do Apodi-Mossoró-RN. In: CARVALHO, R. G. (Org.). **Rio Apodi Mossoró: Meio Ambiente e Planejamento**. Mossoró/RN. EDUERN, 2021. p. 37-62.
- LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. Florida: CRC Press, **Boca Raton**, 1988.
- LEW, A. E. et al. A msp1 α polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 325-335, 2002.
- LICARI, E. et al. First detection of tick-borne pathogens of dogs from Malta. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 396–399, 2017.
- LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Editora Museu de Zoologia USP/FAPESP, p.291, 2000.
- LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1121-1140, 2010.
- LIU, J. et al. Sensitivity and specificity levels of two rapid assays for antibodies to *Anaplasma* spp. in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 2, p. 290-293, 2017.
- LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.20, p.418-430, 1998.
- LOBETTI, R.G. et al. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.63-68, 2002.

LOPES, M. G. et al. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* and probable exposure to *Rickettsia amblyommatis* in dogs and cats in Natal, RN. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 151-156, 2019.

LOPES, M.G. et al. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** 7, 380–385, 2018.

MACHADO, G. P. et al. Anaplasmosse trombocítica canina - uma breve revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária [online]**, 2010.

MACHADO, R. Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 262-266, 2006.

MACIEIRA, D.D.B., et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MACINTIRE, D. K. et al. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 3, p. 325–329, 2002.

MAHACHI, K. et al. Predominant risk factors for tick-borne co-infections in hunting dogs from the USA. **Parasites & vectors**, v. 13, p. 1-12, 2020.

MAKINO, H. et al. Ehrlichia canis detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 310-314, 2016.

MALHEIROS, J. et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 893–900, 2016.

MALIK, M. I. et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). **Veterinary Medicine and Science**, v. 4, n. 2, p. 126–132, 2018.

MARQUES, J. W. et al. Hepatozoonose em mamíferos silvestres e domésticos: revisão de literatura Hepatozoonosis in wild and domestic mammals: literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 140-156, 2022.

MATEI, I. A. et al. A Molecular detection of *Anaplasma platys* infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. **Parasites & Vectors** 9:157, 2016.

MATHEW, J. S. et al. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life- cycle characters. **Journal of Parasitology**, v. 86, 366-372, 2000.

MAVROMATIS, K. et al. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4015-4023, 2006.

MAZEPA, A. W. et al. Clinical presentation of *Anaplasma phagocytophilum*-seropositive dogs residing in an endemic area. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p. 405-12, 2010.

MBASSA, G. K.; POULSEN, J. S. D. Comparison between a modified emocytometric technique and electronic counters in goat blood cell counting. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 38, p. 350-356, 1991.

MCBRIDE, J. W, et al. Kinetics of Antibody Response to *Ehrlichia canis* Immunoreactive Proteins. **Infection and immunity**, v. 71, n.5, p. 2516-2524, 2003.

MCFEE, R. B. Tick borne illness - Anaplasmosis. **Disease-a-Month**, v. 64, n. 5, p. 181-184, 2018.

MELO, A. L. T.; et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 112–116, 2016.

MELO, A. T. L. et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. In dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick borne Disease**, Berlin, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.

MIRANDA, R. L. et al. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. **Res Vet Sci**, 97(2): 325-328, 2014.

MONGRUEL, A. C. B. et al. Molecular detection of vector borne pathogens in anemic and thrombocytopenic dogs in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 505-513, 2018.

MORAES-FILHO, J. et al. Comparative evaluation of the vector competence of four South american populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLoS One**, v. 10, n. 9, 2015.

MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Trop**, 117(1):51-55, 2011.

MOREIRA, S.M. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciênc. Rur.**, v.35, p.958-960, 2005.

MOVILLA, R. et al. Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 131, 2017.

MUNDIM, E. C. S. et al. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência**, v. 12, n. 2, p. 107-115, 2008.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

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

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

- OLIVEIRA, G. M. B. et al. Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101409, 2020.
- OLIVEIRA, L. et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 55-56, 2009.
- OTRANTO, D. et al. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3316-3324, 2010.
- PACHECO, T. A. et al. Serological and molecular survey of tick-borne pathogens among dogs in northern Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 26, n. 4, 2021.
- PALUDO, G. R. et al. *Hepatozoon* spp: report of some cases in dogs in Brasilia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.243-248, 2003.
- PARPINELLI, N. et al. Ocorrência de *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. em cães no estado do Paraná - Revisão de Literatura. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, n. 2, p. 86-93, 2017.
- PASCHOAL, A. T. P. et al. Molecular detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in a hospital population of dogs clinically diagnosed with hemoparasitosis. **Semina: ciências agrárias**. v. 41, n. 5, p. 2143-2152, 2020.
- PASSOS, L.M.F. et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 81-85, 2005.
- PAULINO, P. G. et al. Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p.160-165, 2018.
- PENNISI, M. G. et al. Anaplasma, Ehrlichia and Rickettsia species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 5, p. 542-548, 2017.
- PEREIRA, B. L. A. R. et al. Ocorrência de *Babesia* spp. em cães utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e1810211907-e1810211907, 2021.
- PETERKOVÁ, K. et al. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v.22, p.167-171, 2008.
- PETROV, E. A. et al. Effects of doxycycline treatment on hematological and blood biochemical parameters in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **Macedonian Veterinary Review**, v. 41, n. 1, p. 99-105, 2018.
- PRAKASH, B. K. et al. Detection of *Hepatozoon canis* in the Brown Dog Tick and Domestic Dogs in Peninsular Malaysia. **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 5, p.1346-1348, 2018.

- QIU, Y. et al. Tick-borne haemoparasites and Anaplasmatidae in domestic dogs in Zambia. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 4, p. 988-995, 2018.
- RAMOS, C. A. N. et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Rev. Bras. Parasitol**, v. 18, supl. 1, p. 58-62, 2009.
- RAMOS, C. A. N. et al. Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, v.24, n.2, p.247-250, 2015.
- RAMOS, R. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (North-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, 2010.
- REIS, C. M. M.; PINTO, L. C. Erliquiose Monocítica Canina: Relato de Caso. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2017.
- RIBEIRO, C. M. et al. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 129-136, 2017.
- RIBEIRO, M.F.B. et al. Frequency of anti- *Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.42, p.511-517, 1990.
- RIZZI, T. E. et al. **Normal Hematology of the Dog**. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Schalm's Veterinary Hematology. 6 ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, p. 799-810, 2010.
- ROTONDANO, T. E. F et al. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. In dogs from a semiarid of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v 24, p. 52-58, 2015.
- ROTONDANO, T. et al. *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. n.26, v.2, p. 211-215, 2017.
- RUBINI, A. S. et al. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v. 97, n. 2, p. 91-93, 2005.
- RUBINI, A. S. et al. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**. v.102, p.895-899, 2008.
- RUCKSAKEN, R., et al. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. **Veterinary world**, v. 12, n. 5, p. 700, 2019.
- SAITO, T. B. et al. Canine infection by *Rickettsia* and *Ehrlichia* in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n.1, p. 102-108, 2008.

SAITO, T. B., WALKER, D.H. Ehrlichioses: An important one health opportunity. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 3, p. 20, 2016.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. v. 1, 1 ed. Rio de Janeiro: Roca. Cap. 9, p. 95-111, 2018.

SANTARÉM, V. A, AGUIAR, M. A. Erliquiose Canina. In: MEGID, J, RIBEIRO, M. G, PAES, A. C. (Org.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, p. 95-111, 2016.

SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, 179: 145-148, 2009.

SANTOS, H. A. et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 348, p. 1-10, 2013.

SANTOS, M. A. B. et al. Screening of *Cercopithifilaria bairdii* and *Hepatozoon canis* in ticks collected from dogs of Northeastern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 3, p. 605-608, 2018.

SCHNITTGER, Leonhard et al. Babesia: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788-1809, 2012.

SCHOEMAN, J. P. Canine babesiosis. Onderstepoort, **Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 1, p. 59-66, 2009.

SHIBATA, S. I. et al. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1331-8, 2000.

SILAGHI, C. et al. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2017.

SILVA, A. B. et al. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. **Gaceta Médica de México**, v. 150, p. 171-174, 2014.

SILVA, C. B. et al. A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.28, n.5, p.529-35. 2016.

SILVA, G. C. et al. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Paraná. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, G. R. S. et al. Detecção molecular de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. em *Rhipicephalus sanguineus* e cães do Centro de Controle de Zoonoses de Belém, estado do Pará. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 13, pág. e475101321392-e475101321392, 2021.

SILVA, L. S. **Erliquiose e anaplasmose canina em Teresina, Piauí**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí (UFPI). 2010. Acesso em: 17 fev. 2024.

SILVA, M. C. A. et al. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 892-900, 2014.

SOARES, R. et al. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n.1, p. 301-306, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 336, p. 1-18, 2016.

SOUSA, K. C. M. et al. Anaplasmatidae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n.16, p. 3424-3437, 2017.

SOUSA, K. C. M. et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 4, p. 525-531, 2013.

SOUZA, E. A. R. et al. Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 27, 514–520, 2018.

SPOLIDORIO M. et al. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357-361, 2009.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, p. 253-255, 2011.

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

TANIKAWA, A. et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 474–477, jun. 2013.

TATEISHI, V. et al. Identificación hematológica y molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 26, n. 1, p. 111-118, 2015.

TAYYUB, M. et al. Genetic Diversity of Canine *Babesia* Species Prevalent in Pet Dogs of Punjab, Pakistan. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 439, 2019.

THOMSON, K. et al. A new TaqMan method for the reliable diagnosis of *Ehrlichia* spp. in canine whole blood. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 350, p. 1-7, 2018.

TILLEY, L. P. et al. **Consulta veterinária em 5 minutos**. 2 ed. Barueri: Manole, 2003.

TOMMASI, A. S. et al. *Anaplasma platys* in Bone Marrow Megakaryocytes of Young Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2231-2234, 2014.

TORRES, F. D. et al. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004.

TRAPP, S. M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

TURCHETTI, A. P. **Perfil de expressão gênica e níveis de citocinas em macrófagos caninos com diferentes graus de susceptibilidade à infecção por Leishmania infantum**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária - UFMG. 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-9STPFU>>. Acesso em: 20 mai. 2022.

UENO, T. E. H. et al. *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, 2009.

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

VELOSO, S. K. S. et al. Perfil hematológico e epidemiológico em cães com babesiose, no município de Fortaleza/CE. **Ciênc. Anim**, p. 56-65, 2021.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.58-62, 2004.

VIEIRA, E. M. et al. Babesiose canina: aspectos hematológicos e comparação de métodos de diagnóstico. **Revista Unimontes Científica**, v. 23, n. 1, p. 1-16, 2021.

VIEIRA, F. T. et al. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 249, p. 43-48, 2018.

VIEIRA, R. F. C. et al. Ehrlichiosis in brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

VIEIRA, R. F. et al. Serological survey of Ehrlichia species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 335-340, 2013.

VINCENT-JOHNSON, N.A. et al. A new Hepatozoon species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **Journal of Parasitology**, n.83, p.1165-1172, 1997.

WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 307-317, 1997.

WITTER, R. et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoses trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitoses em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências agrárias**, v. 6, n. 34, p. 3811-3822, 2013.

World Health Organization. **Global Vector Control Response 2017–2030** Geneva: WHO, 2017.

YABSLEY, M. J. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii* and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 279-285, 2008.

YABSLEY, M. J.; SHOCK, B. C. Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.2, p.18–31, 2013.

ZANELLA, J. R. C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.510-519, 2016.

ZHANG, C. J. et al. Epidemiological survey of ticks and tick-borne pathogens in pet dogs in south-eastern. **Parasite**, v. 24, n. 35, 2017.

ZHANG, X. et al. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.15, n.7, p.1080-1088, 2008.

3 HIPÓTESE

Diante de condições climáticas favoráveis ao vetor *R. sanguineus* s.l. e a presença de hemoparasitos transmitidos por ixodídeos no Estado do Rio Grande do Norte, considerou-se a hipótese de que cães de população hospitalar na região do alto oeste potiguar podem ser naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, o que contribui para a ocorrência de coinfeções e manifestações clínicas mais graves nos animais da região.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Determinar a frequência e a caracterização molecular de *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães com suspeita de doenças transmitidas por vetores ixodídeos na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, além de descrever os aspectos epidemiológicos e clínicos relacionados à infecção por esses hemoparasitos nos animais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detectar o DNA de *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães com suspeita clínica e/ou laboratorial de doenças transmitidas por vetores em Mossoró, RN utilizando a PCR;
- Determinar a frequência de *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em monoinfecção, coinfecção e multi-infecção em cães com suspeita de doenças transmitidas por vetores em Mossoró, RN;
- Determinar a associação entre o perfil epidemiológico e clinicopatológico de cães monoinfectados, coinfectados e multi-infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e/ou *Hepatozoon canis*;
- Descrever as alterações em hematócrito e plaquetas de cães infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e/ou *Hepatozoon canis* correlacionando aos diferentes tipos de infecção;
- Realizar análise filogenética dos agentes *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* por meio da comparação das sequências obtidas com as disponíveis no GenBank;

CAPÍTULO 1:**Patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s.l. em monoinfecções, coinfecções e multi-infecções em cães no semiárido brasileiro: frequência e caracterização molecular**

Bruno Vinícios Silva de Araújo; Isa Lorena Pinto Dantas Bezerra; Amanda Haisi; João Pessoa Araújo Júnior, Juliana Fortes Vilarinho Braga; João Marcelo Azevedo de Paula Antunes.

Submetido ao periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)
Fator de impacto: 1.3 (2022) – Qualis CAPES: A2

Patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s.l. em monoinfecções, coinfecções e multi-infecções em cães no semiárido brasileiro: frequência e caracterização molecular

Bruno Vinícios Silva de Araújo; Isa Lorena Pinto Dantas Bezerra; Amanda Haisi; João Pessoa Araújo Júnior, Juliana Fortes Vilarinho Braga; João Marcelo Azevedo de Paula Antunes.

Resumo

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) é um ixodídeo amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, sendo o cão doméstico seu hospedeiro preferencial. No Brasil, cães são vulneráveis à infecção por diversos agentes patogênicos transmitidos por este carrapato, incluindo os protozoários *Hepatozoon canis* e *Babesia vogeli* e as bactérias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, no entanto, dados sobre a frequência e caracterização molecular desses patógenos no semiárido nordestino ainda são escassos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli* e *H. canis* em monoinfecções, coinfecções e multi-infecções, além de caracterizar filogeneticamente esses hemoparasitas. Para isso, 181 cães de população hospitalar sob suspeita clínico-laboratorial de hemoparasitoses foram selecionados e amostras sanguíneas foram coletadas para a pesquisa direta de hemoparasitas em lâmina e extração de DNA para realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram considerados animais monoinfectados, coinfectados e multi-infectados aqueles em que houve detecção de um, dois e três ou mais patógenos, respectivamente. Os dados foram expressos em frequência simples e porcentagem obtidos através do programa estatístico SAS System for Windows 9.0. Para verificar a associação dos diferentes métodos de diagnóstico frente a infecção foram utilizados os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher. A PCR revelou que 72,3% (131/181) dos cães estavam infectados por pelo menos um dos agentes pesquisados. Destes, 44,7% (81/181) estavam monoinfectados, 21,5% (39/181) coinfectados e 6,1% (11/181) multinfectedos. *E. canis* foi o agente mais detectado nos animais (41,9%, 76/181), seguido por *H. canis* (35,4%, 64/181), *A. platys* (21,5%, 39/181) e *B. vogeli* (7,7%, 14/181), onde 84,6% (33/39) dos animais coinfectados estavam parasitados concomitantemente por diferentes espécies de bactérias e protozoários. Mórulas de *Anaplasma* sp. foram observadas em 20,0% (36/180) e gametócitos de *Hepatozoon* sp. em 15,0% (27/180) dos cães. Mórulas de *Ehrlichia* sp. foram visualizadas em 11,1% (20/180) e merozoítos de *Babesia* sp. em 1,7% (3/180) dos animais. Dos cães positivos na pesquisa direta em esfregaço sanguíneo para *Anaplasma* sp., *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e *Hepatozoon* sp., 20,40% (10/49), 2,0% (1/49), 4,1% (2/49) e 6,1% (3/49) não corresponderam ao DNA de *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* e *H. canis* à PCR, respectivamente. A relação filogenética do gene 16S rRNA das sequências recuperadas para *A. platys* e *E. canis* e do gene 18S rRNA para *B. vogeli* e *H. canis* demonstraram grande similaridade às amostras de referência para essas espécies de outras regiões do Brasil e do mundo. Este é o primeiro e o mais extenso trabalho a utilizar a PCR como método de diagnóstico da infecção por *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli* e *H. canis* e caracterizar filogeneticamente esses agentes no estado do Rio Grande do Norte. Os diversos padrões de coinfecções e multinfecções relatados reforçam a necessidade de diagnóstico, vigilância e medidas preventivas adequadas para garantir a saúde de animais de áreas endêmicas para *R. sanguineus* s.l., uma vez que a associação desses patógenos pode exacerbar as alterações clínicas e dificultar a instituição de tratamento adequado para cada espécie envolvida, contribuindo para a disseminação da doença e piora no prognóstico do paciente.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*; *Babesia vogeli*; *Ehrlichia canis*; *Hepatozoon canis*; PCR; Filogenia.

1. Introdução

As doenças emergentes e reemergentes transmitidas por vetores têm-se mostrado um desafio para a medicina veterinária e humana (Fonseca et al., 2022), sendo de grande importância para a saúde global (OLIVEIRA et al., 2020). Os carrapatos são os principais artrópodes responsáveis pela disseminação de agentes patogênicos (Jongejan; Uilenberg, 2004; Fuente et al., 2015) e, devido as mudanças climáticas e ao aumento da acessibilidade a determinados nichos ambientais, veem expandindo seus limites geográficos (Han et al., 2016).

No Brasil, é relatado que a ocorrência das espécies de carrapatos é bastante variável, sendo as características epidemiológicas das regiões determinantes para a ocorrência em cada localidade (Labruna; Pereira, 2001; Labruna et al., 2005). A dispersão desses vetores e as alterações no seu habitat podem influenciar a ocorrência de patógenos em novas localidades, além de contribuir para o aumento na incidência de doenças endêmicas (Kilpatrick; Randolph, 2012).

Dentre os agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos frequentemente relatados no território brasileiro que acometem cães, podemos destacar as bactérias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, e os protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* (Malheiros et al., 2016; Guimarães et al., 2021). Esses hemoparasitos são responsáveis por diversas manifestações clínicas inespecíficas nos hospedeiros infectados (Gonçalves et al., 2014; Bouzouraa et al., 2017).

Clinicamente, os animais acometidos podem apresentar hipertermia, apatia, mucosas hipocoradas, perda de peso e anorexia, sinais clínicos inespecíficos e comuns em infecções por *E. canis*, *A. platys*, *B. vogeli* e *H. canis* (Malik et al., 2018; Lima et al., 2021; Fonseca et al., 2022; Cevidane et al., 2023), os quais podem ser agravados a depender do status imunológico do cão e da presença de coinfeções (Movilla et al., 2017). Diante da importância e semelhança clínica dessas doenças, o diagnóstico precoce e preciso é fundamental para instituição de medidas de tratamento adequadas e prognóstico favorável (Rucksak et al., 2019; Guimarães et al., 2021).

O diagnóstico microscópico das hemoparasitoses é comumente utilizado na rotina clínica, no entanto, a sensibilidade é baixa e varia a depender da fase da doença e da experiência

do profissional laboratorista (Kaewkong et al., 2014; Buddhachat et al., 2020; Kaur et al., 2020). Diante das limitações citadas, os métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se destacam por possuírem alta sensibilidade e especificidade, permitindo o diagnóstico nas diferentes fases de infecção, ao mesmo tempo em que identificam com precisão diferentes patógenos (Masseti et al., 2020; Silva et al., 2021).

Os aspectos climáticos do semiárido brasileiro que possuem irregularidade pluviométrica têmporo-espacial e elevadas temperaturas médias anuais (Lemos Filho; Espínola; Oliveira Júnior, 2021) favorecem a disseminação de vetores ixodídeos, principalmente *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.). Esses carrapatos são menos dependentes de ambientes úmidos para a sobrevivência (Tanikawa et al., 2013), e possuem grande importância epidemiológica na transmissão das hemoparasitoses no Brasil (Gray et al., 2013).

No território brasileiro, há diversos registros de agentes transmitidos por carrapatos infectando cães (Melo et al., 2016; Mongruel et al., 2018; Guimarães et al., 2021; Vieira et al., 2021; Bittencourt et al., 2022; Fonsêca et al., 2022). Apesar das condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de *R. sanguineus* s.l., ainda há uma escassez de estudos sobre a ocorrência e caracterização de patógenos transmitidos por este vetor em cães no semiárido nordestino. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de *A. platys*, *B. canis*, *E. canis* e *H. canis* em monoinfecção, coinfecção e multi-infecção em cães em uma área endêmica para *R. sanguineus* s.l. no Brasil e realizar a caracterização molecular desses patógenos.

2. Material e métodos

2.1 Área do estudo e definição da amostra

O estudo foi realizado no município de Mossoró (5°11'15''S, 37°20'39''W) que possui clima semiárido, localizado no Estado do Rio Grande do Norte. Segundo a classificação climática de W. Köppen, o município é caracterizado por clima tropical chuvoso, com inverno seco e estação chuvosa no verão, com temperaturas elevadas e precipitação pluviométrica anual muito irregular (Lemos Filho; Espínola; Oliveira Júnior, 2021).

Na pesquisa foram incluídos 181 cães independentemente do sexo, raça e idade, sob suspeita clínica e/ou laboratorial de infecção por *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e/ou *Hepatozoon canis* provenientes de hospitais públicos e populares. O cálculo amostral foi

determinado segundo Heinrich et al. (2021), utilizando a fórmula $n = Z^2 \alpha / 2 \cdot P(1-P) / e^2$, considerando o grau de confiança (Z) de 1,96, probabilidade de sucesso (P) de 50% e erro amostral (e) de 9%.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Parecer N° 25/2022).

2.2 Coleta de sangue dos cães

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção cefálica ou jugular mediante antisepsia adequada e acondicionadas em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 4 °C para extração de DNA. Adicionalmente, foram confeccionadas lâminas de esfregaços sanguíneos, coradas utilizando o método panótico rápido para a pesquisa de hemoparasitas e visualizadas sob imersão em objetiva de 100X utilizando-se microscópio de luz branca.

2.2 Extração de DNA e PCR

A extração de DNA das amostras sanguíneas foi realizada utilizando-se o kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Após a extração, o material genômico foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop™ Lite, Thermo Scientific) e as amostras armazenadas a -20 °C até o momento da PCR.

Como controle endógeno da extração de DNA foi realizada uma PCR direcionada ao gene de β -actina de cão e para detecção do DNA de *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e programas de amplificação específicos validados em trabalhos previamente publicados (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos, programas de amplificação e tamanho de produtos amplificados por PCR para beta-actina canina, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* utilizados nesta pesquisa.

Gene alvo	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Programa de amplificação	Produto (pb)	Referência
β-actina de cão	Actb-F	GGCATCCTGACCCTGAAGTA	Desnaturação inicial: 95°C, 10' 35 ciclos de:	98pb	Turchetti (2014)
	Actb-R	CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT	Desnaturação: 95°, 30'' Anelamento: 60°C, 30'' Extensão: 72°C, 30'' Extensão final: 72°C, 5'		
<i>A. platys</i> (16S rRNA)	EPLAT5-F	TTTGTCGTAGCTTGCTATGA T	Desnaturação inicial: 95°C, 5' 40 ciclos de:	386pb	Matei et al. (2016)
	EPLAT3-R	CTTCTGTGGGTACCGTC	Desnaturação: 94°, 30'' Anelamento: 58°C, 30'' Extensão: 72°C, 45'' Extensão final: 72°C, 5'		
<i>B.vogeli</i> (18S rRNA)	BAB1	GTGAACCTTATCACTTAAAG G	Desnaturação inicial: 94°C, 2' 35 ciclos de:	602pb	Duarte et al. (2008)
	BAB4	CAACTCCTCCACGCAATCG	Desnaturação: 94°, 30'' Anelamento: 56°C, 30'' Extensão: 72°C, 60'' Extensão final: 72°C, 5'		
<i>E.canis</i> (16S rRNA)	EHO-F	AGAACGAACGCTGGCGGCA AGCC	Desnaturação inicial: 94°C, 10' 40 ciclos de:	478pb	Bulla et al. (2004)
	EHO-R	CGTATTACCGCGGCTGCTGG C	Desnaturação: 94°, 60'' Anelamento: 60°C, 60'' Extensão: 72°C, 60'' Extensão final: 72°C, 4'		
	ECA-F	CAATTATTTATAGCCTCTGG CTATAGGAA	Desnaturação inicial: 94°C, 10' 40 ciclos de:	389pb	
	ECA-R	TATAGGTACCGTCATTATCT TCCCTAT	Desnaturação: 94°, 60'' Anelamento: 60°C, 60'' Extensão: 72°C, 60'' Extensão final: 72°C, 4'		
<i>H.canis</i> (18S rRNA)	HC-18S-F	CACCAGGTCCAGACATAGA AAG	Desnaturação inicial: 95°C, 3' 35 ciclos de:	306pb	Kaur et al. (2020)
	HC-18S-R	AAGCTTACCAGCCAAGGTTA T	Desnaturação: 95°, 30'' Anelamento: 62°C, 30'' Extensão: 72°C, 45'' Extensão final: 72°C, 1'		

As PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 12,5 μ L de master mix (Platinum PCR SuperMix, Cellco®), 1 μ L de cada primer (10 μ M), 9,5 μ L de água DEPC e 1 μ L de DNA. Para amplificação de DNA de *Ehrlichia canis* foi empregada a *nested* PCR, utilizando-se 1 μ L do produto da primeira etapa da PCR como amostra para a segunda reação.

A amplificação do DNA de *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* foi realizada por PCR convencional. Para todas as reações foram utilizados como controle positivo DNA de amostras sabidamente positivas para os agentes pesquisados, como controle negativo, água DEPC.

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, utilizando GelRed® como corante evidenciador de DNA por 50 minutos a 120 volts. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig®), seguindo recomendações do fabricante. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Proteinsimple®) e registrado utilizando-se o programa AlphaImager Mini System. Foram consideradas positivas para *A. platys*, *B. canis*, *E. canis* e *H. canis* as amostras que apresentaram um produto amplificado de aproximadamente 386pb, 602pb, 389pb e 306pb, respectivamente.

2.4 Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos de PCR foram submetidos à purificação utilizando esferas magnéticas (SpeedBead Magnetic Carboxylate Modified Particles, Azide 0,05%, GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire), e sua concentração e pureza avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ Spectrophotometers, Thermo Scientific, Waltham, EUA). O sequenciamento foi realizado no analisador genético 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), pelo método Sanger, utilizando *primers* específicos para cada espécie (Tabela 1) em ambas as direções.

As sequências *senso* e *antisenso* foram cortadas e montadas utilizando o software Geneious Prime (versão 2020.2.1). Posteriormente, foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados de nucleotídeos GenBank® utilizando a ferramenta de nucleotídeos BLAST® para verificar o percentual de identidade. As sequências genéticas foram alinhadas com sequências conhecidas obtidas do GenBank com a ferramenta Mafft v7.520 (Katoh; Standley, 2013). Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi reconstruída usando o IQ-TREE versão 2.2.0.3 (Minh et al., 2020), empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). A visualização e edição da reconstrução foram realizadas utilizando o software FigTree v.

2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos em frequência simples e porcentagem obtidos através do programa estatístico SAS System for Windows 9.0 (SAS Inst., Cary, Estados Unidos). Para verificar a associação das diferentes variáveis estudadas frente a infecção foram utilizados os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher. Este último utilizado quando a frequência esperada foi inferior a 5.

3. Resultados

Todas as 181 amostras submetidas à PCR para detecção do gene beta-actina de cão amplificaram um produto de aproximadamente 98 pb, sendo consideradas positivas e confirmando a viabilidade do material genômico utilizado.

E. canis foi o agente mais detectado à PCR nos animais deste estudo (41,9%, 76/181), seguido por *H. canis* (35,4%, 64/181), *A. platys* (21,5%, 39/181) e *B. vogeli* (7,7%, 14/181) (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de positividade à PCR associada aos tipos de infecção[‡] em cães de população hospitalar naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em uma área do semiárido brasileiro, 2023.

Variáveis	Multi-infecção		Coinfecção		Monoinfecção		p-valor
	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%	
PCR(+) ¹ <i>Anaplasma platys</i>							
Sim	10	90,9	18	46,2	11	13,6	<0,001**
Não	01	9,1	21	53,8	70	86,4	
PCR(+) <i>Babesia vogeli</i>							
Sim	06	54,5	06	15,4	02	2,5	<0,001**
Não	05	45,5	33	84,6	79	97,5	
PCR(+) <i>Ehrlichia canis</i>							
Sim	10	90,9	25	64,1	41	50,6	0,022**
Não	01	9,1	14	35,9	40	49,4	
PCR(+) <i>Hepatozoon canis</i>							
Sim	08	72,7	29	74,4	27	33,3	<0,001*
Não	03	27,3	10	25,6	54	66,7	

* Significância estatística (p<0,05 – Qui-quadrado); ** Significância estatística (p<0,05 – Exato de Fisher); [‡] Categoria “Negativos” excluída da análise.

¹PCR(+): positivo à PCR.

Foi observada monoinfecção pelos patógenos estudados em 44,7% (81/181) das amostras. Destes, o DNA de *E. canis* foi o mais frequentemente detectado em 22,6% (41/181)

dos animais, seguido por *H. canis* em 14,9% (27/181), *A. platys* em 6,1% (11/181) e *B. vogeli* em 1,1% (2/181).

Dos cães analisados, 21,5% (39/181) estavam coinfectados, sendo a coinfecção por *E. canis* e *H. canis* a mais frequente, observada em 8,8% (16/181) dos animais, seguida pelas coinfecções por *A. platys* com *H. canis* em 6,6% (12/181), *A. platys* com *E. canis* em 2,8% (5/181), *E. canis* com *B. vogeli* em 2,2% (4/181), *A. platys* com *B. vogeli* em 0,5% (1/181) e *B. vogeli* com *H. canis* em 0,5% (1/181) dos cães. Esses resultados revelam que 84,6% (33/39) dos animais com co-infecções estavam infectados concomitantemente por bactérias e protozoários.

Dentre as multinfecções, a mais frequente foi *E. canis* com *A. platys* e *H. canis*, presente em 2,8% (5/181) dos casos, seguida por *B. vogeli* com *A. platys* e *E. canis* em 1,7% (3/181), *E. canis* com *B. vogeli* e *H. canis* em 0,5% (1/181) e *A. platys* com *B. vogeli* e *H. canis* em 0,5% (1/181). Um animal (0,5%) estava multinfestado por todos os quatro patógenos pesquisados.

Quanto à pesquisa direta dos agentes ao esfregaço sanguíneo (Tabela 3), mórulas de *Anaplasma* sp. foram observadas em 20% (36/180) e gametócitos de *Hepatozoon* sp. em 15% (27/180) dos cães analisados. Mórulas de *Ehrlichia* sp. foram visualizadas em 11,11% (20/180) e merozoítos de *Babesia* sp. em 1,67% (3/180) dos animais. A frequência de animais positivos à hematoscopia que, após confirmação molecular, constatou-se não corresponder ao DNA de *A. platys*, *H. canis*, *E. canis* e *B. vogeli* foi de 20,4% (10/49), 6,1% (3/49), 4,1% (2/49) e 2% (1/49) dos cães, respectivamente.

Tabela 3. Frequência da positividade à pesquisa direta em esfregaço sanguíneo associada aos tipos de infecção¹ em cães de população hospitalar naturalmente infectados por *Anaplasma* sp., *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp., *Hepatozoon* sp. em uma área do semiárido brasileiro, 2023.

Variáveis	Multi-infecção		Coinfecção		Monoinfecção		Negativo		p-valor
	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%	
ES(+) ² para <i>Anaplasma</i> sp.									
Sim	04	36,4	11	28,2	11	13,6	10	20,4	0,111
Não	07	63,6	28	71,8	70	86,4	39	79,6	
ES(+) para <i>Babesia</i> sp.									
Sim	0	0,0	0	0,0	02	2,5	01	2,0	1,0
Não	11	100,0	39	100,0	79	97,5	48	98,0	
ES(+) para <i>Ehrlichia</i> sp.									
Sim	03	27,3	05	12,8	10	12,3	02	4,1	0,105
Não	08	72,7	34	87,2	71	87,7	47	95,9	
ES(+) para <i>Hepatozoon</i> sp.									
Sim	02	18,2	10	25,6	12	15,0	03	6,1	0,071
Não	09	81,8	29	74,4	68	85,0	46	93,9	

Significância estatística ($p < 0,05$ – Exato de Fisher).

¹Tipo de infecção determinado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

²ES(+): positivo ao esfregaço sanguíneo.

Ao analisar a associação da positividade à PCR ao tipo de infecção, constatou-se que todas as variáveis (patógenos pesquisados) estavam significativamente associadas a monoinfecções, coinfecções e multinfecções (Tabela 2), diferentemente da positividade dos agentes no esfregaço sanguíneo, que demonstrou não estar associado aos diferentes perfis de infecção (Tabela 3).

Foram selecionadas aleatoriamente 10 amostras de cada agente pesquisado para sequenciamento genético, sendo todas provenientes de casos de monoinfecção. Os resultados do alinhamento revelaram que todas as sequências geradas neste estudo foram idênticas entre os *amplicons* de cada patógeno. Por esta razão, apenas uma sequência de cada agente foi depositada na base de dados do Genbank. Foi observada 100% de identidade entre a sequência consenso e as sequências obtidas do GenBank na pesquisa BLASTn (GenBank: *A. platys* CP046391.1, *E. canis* MK281328.1, *B. canis vogeli* e *H. canis* AY461378). Sequências parciais do gene 16S rRNA (*E. canis* e *A. platys*) e do gene 18S rRNA (*B. vogeli* e *H. canis*) obtidas neste estudo foram depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso PP211477, PP211197, PP211446 e PP211449, respectivamente.

No momento da análise do cromatograma das sequências de *H. canis*, observou-se que nove das 10 amostras de *H. canis* selecionadas apresentaram picos duplos em um sítio na posição 1873 (Adenina/Guanina). Essas sequências não foram depositadas no banco de dados GenBank.

A análise filogenética de máxima verossimilhança da pequena subunidade do gene do RNA ribossômico mostrou que a sequência de *Hepatozoon canis* utilizada foi agrupada com outras linhagens de *H. canis* (número de acesso: AY461378, MN181508), divergindo de outras espécies do gênero *Hepatozoon* (Figura 1).

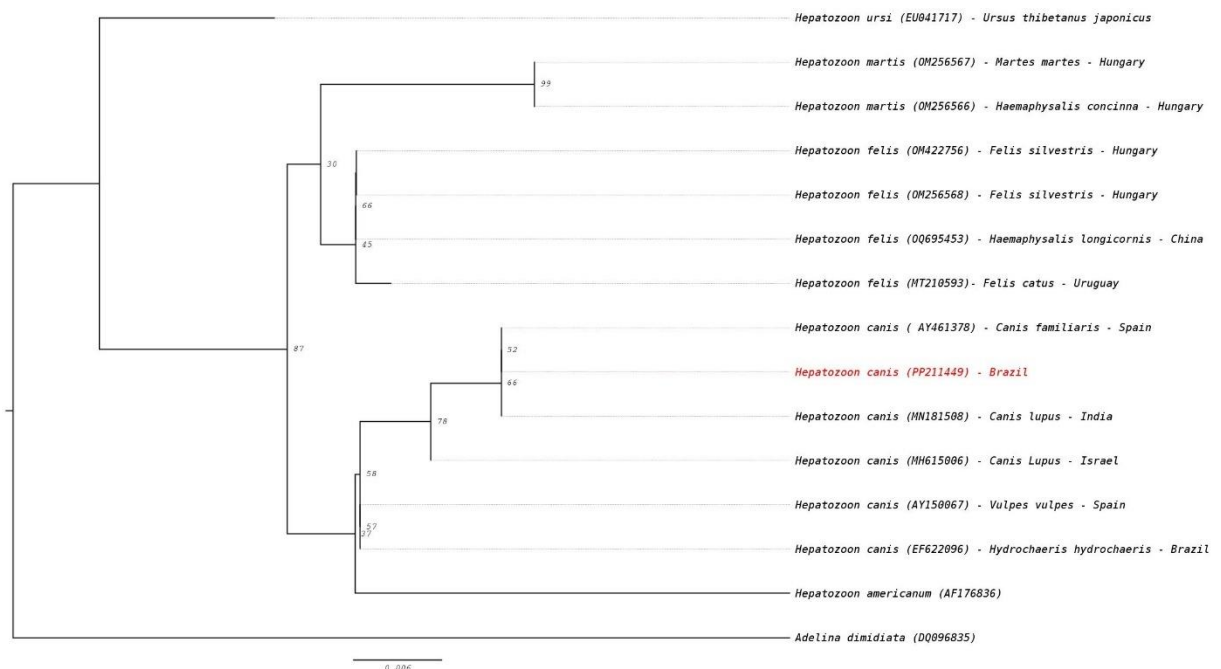


Figura 1. Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* detectado em cães de população hospitalar provenientes de uma área no semiárido brasileiro, empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder, usando o programa IQ-TREE versão 2.2.0.3. Entre parênteses o número de acesso da sequência obtida neste estudo e de outras provenientes do banco de dados GenBank.

A sequência de *Babesia vogeli* agrupou-se com outras cepas de *B. vogeli* descritas em diferentes regiões geográficas (Índia, Cabo Verde, Taiwan, México, Tailândia, China, EUA), bem como uma sequência descrita em Recife, Brasil (acesso GenBank: FJ588003) (Figura 2).

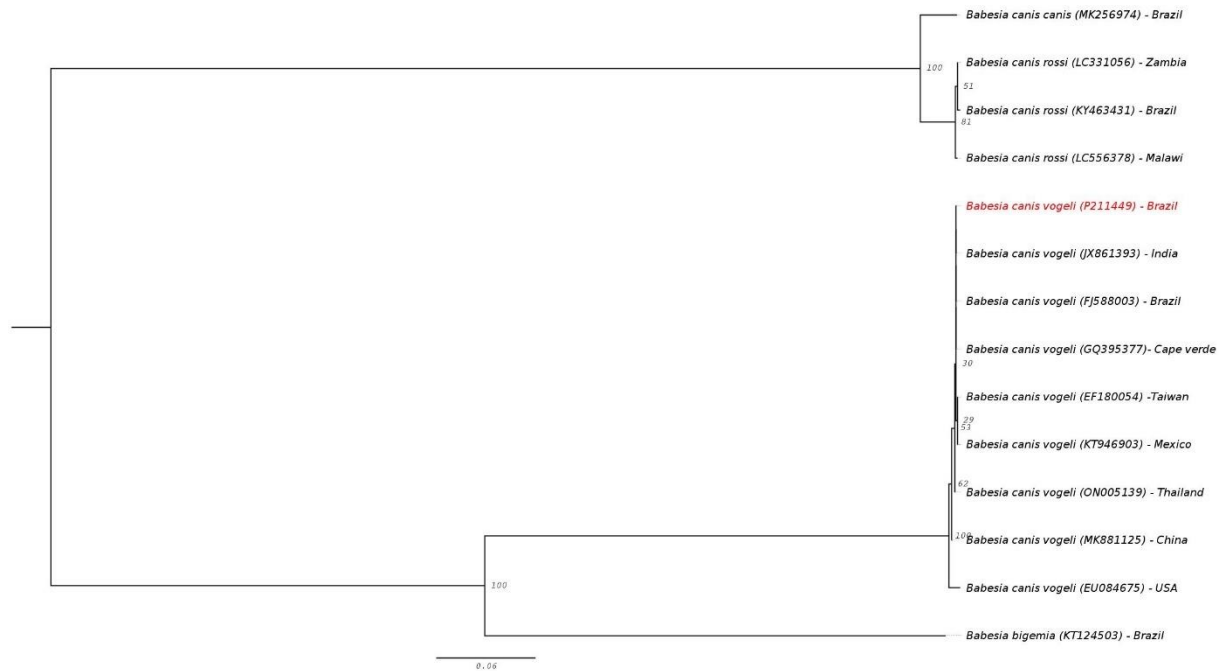


Figura 2. Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 18S rRNA de *Babesia vogeli* detectado em cães de população hospitalar provenientes de uma área no semiárido brasileiro, empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder, usando o programa IQ-TREE versão 2.2.0.3. Entre parênteses o número de acesso da sequência obtida neste estudo e de outras provenientes do banco de dados GenBank.

A relação filogenética do gene 16S rRNA das sequências recuperadas para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* demonstrou sua semelhança com diferentes cepas descritas mundialmente, conforme ilustrado na Figura 3.

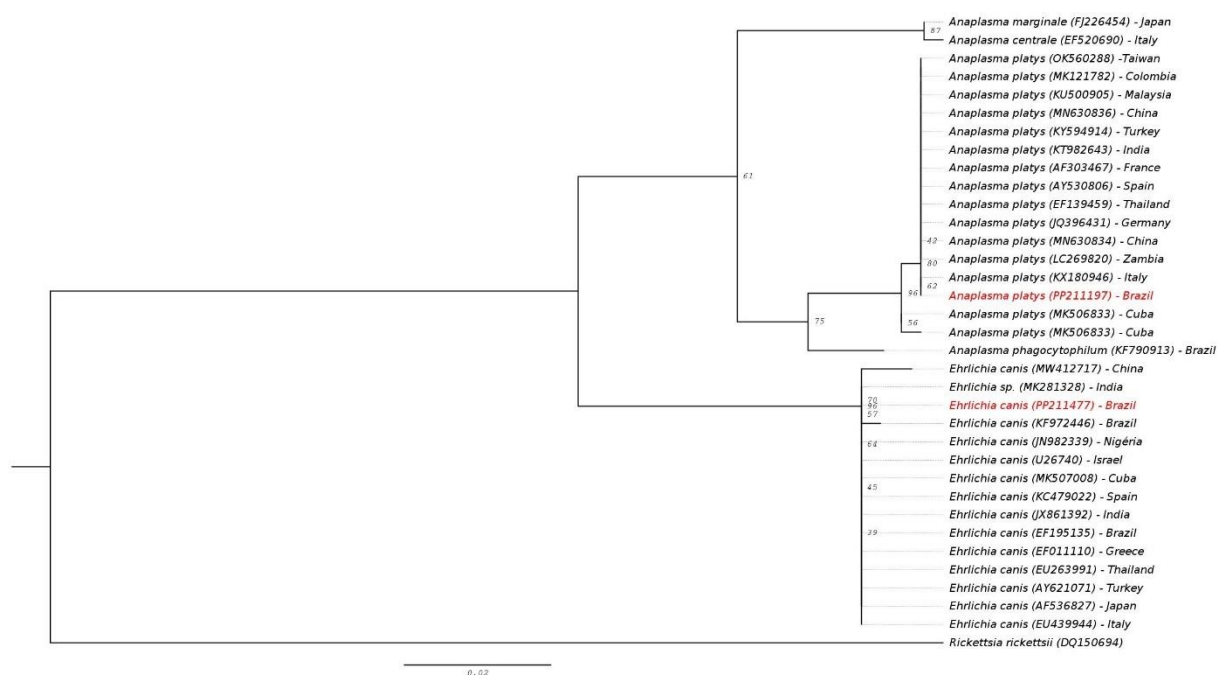


Figura 3. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais de 16S rRNA de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* detectado em cães de população hospitalar provenientes de uma área no semiárido brasileiro, empregando o modelo de ajuste ideal determinado pelo ModelFinder, usando o programa IQ-TREE versão 2.2.0.3. Entre parênteses o número de acesso das sequências obtidas neste estudo e de outras provenientes do banco de dados GenBank.

4. Discussão

Sabe-se que a exposição de cães às hemoparasitoses em todo o mundo está associada ao aumento da atividade dos ixodídeos vetores em regiões com condições climáticas e ambientais favoráveis (Yabsley e Shock, 2013). O nordeste brasileiro apresenta condições climáticas propícias ao desenvolvimento do carrapato vetor *R. sanguineus* s.l. (Tanikawa et al., 2013), aumentando a probabilidade desses animais serem expostos a mais de agente infeccioso transmitido por esse vetor (Rotondano et al., 2017; Lopes et al., 2018), o que evidencia a necessidade de estudos que determinem a ocorrência de múltiplos patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s.l. nessa região.

Este é o primeiro e o mais extenso trabalho a utilizar a Reação em Cadeia da Polimerase como método de diagnóstico para determinar a frequência de infecção únicas e múltiplas por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* e caracterizar filogeneticamente esses agentes no estado do Rio Grande do Norte. Nosso estudo revelou elevada frequência de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em cães de população hospitalar no seminário brasileiro, em que aproximadamente três em cada quatro cães estavam infectados por pelo menos um agente patogênico pesquisado. Embora 44,7% destes estivessem monoinfectados, a frequência de coinfeções (21,5%) e multinfecções (6,1%) também se destacaram.

A elevada frequência desses agentes na região estudada pode ter se dado devido a alguns fatores, como a população de estudo, método de diagnóstico utilizado e a presença e distribuição do vetor. A população analisada, por ser composta por cães com suspeita clínico-laboratorial de hemoparasitoses, pode ter contribuído para a elevada frequência nessa região, além da alta sensibilidade e especificidade do método de diagnóstico utilizado.

Devido a utilização da PCR neste estudo como método de diagnóstico, foi possível identificar não apenas uma exposição ao agente, mas casos de infecção ativa por esses patógenos, demonstrando a real situação dessas hemoparasitoses no tipo de população analisada. Epidemiologicamente, a utilização dessa ferramenta molecular se faz importante por permitir a identificação e distinção de animais sadios dos que são fonte de infecção para outros

vetores e animais, além de favorecer o tratamento adequado direcionado ao patógeno envolvido na infecção.

As condições climáticas favoráveis à presença e distribuição do vetor na região estudada também podem ter influenciado, tendo em vista que habitualmente a transmissão dessas doenças está ligada diretamente ao vetor (Dantas-Torres et al., 2020), além de contribuir para a exposição desses animais a mais de um tipo de hemoparasita, já que a abundância dos ixodídeos aumentam o risco de infecção (Piantedosi et al., 2017; Di Cataldo et al., 2021). O que corrobora com os dados obtidos em nosso estudo, em que 84,62% dos animais coinfectados estavam parasitados concomitantemente por diferentes espécies de bactérias e protozoários.

A erliquiose canina é considerada uma das principais doenças infecciosas na rotina clínica de pequenos animais, provavelmente devido a ampla disseminação do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l. em todo Brasil (Dantas-Torres et al., 2012). Neste estudo, o DNA de *E. canis* foi o mais frequentemente detectado pela nPCR. *A. platys*, outra bactéria da ordem Rickettsiales, foi o terceiro agente com maior ocorrência na população estudada, evidenciando a necessidade de mais pesquisas para um melhor entendimento epidemiológico dessas doenças no estado do Rio Grande do Norte, tendo em vista que 90,9% (10/11) dos animais multi-infectados apresentaram positividade para *E. canis* e *A. platys* (Tabela 2).

A infecção por *B. vogeli* foi a que apresentou a menor detecção entre os patógenos estudados em monoinfecções (2,5%), coinfecções (15,4%) e multinfecções (54,5%) (Tabela 2). A baixa ocorrência desse agente na região nordeste também já foi evidenciada por outros autores que utilizaram a PCR como método de diagnóstico. Braga et al. (2019) relataram uma positividade de 4,8% (15/315) em cães de população hospitalar no estado do Piauí, Costa et al. (2015), obtiveram uma positividade de 0,9% (3/322) em populações caninas de área rural e urbana do interior do Maranhão e Rotondano et al. (2015) observaram uma positividade de 10% (10/100) em cães de população hospitalar na Paraíba. Mesmo com a baixa ocorrência, se faz necessário o acompanhamento periódico desse patógeno por meio de investigações epidemiológicas, tendo em vista que a prevalência desse protozoário pode variar a depender da dispersão do seu vetor *R. sanguineus* s.l. e o aumento da mobilidade dos hospedeiros (Beugnet; Moreau, 2015).

Embora a forma subclínica da babesiose canina no Brasil seja a predominante (Vidotto e Trapp, 2004), possivelmente devido à espécie de *Babesia* sp. mais prevalente no território

nacional ser a *B. vogeli*, animais com o status imunológico comprometido, bem como em casos de coinfeções com outros patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s.l. podem intensificar a gravidade da doença e prejudicar o prognóstico do paciente (Schnittger et al., 2012).

Dados sobre a ocorrência da hepatozoonose canina no semiárido nordestino são escassos. A detecção de *H. canis* em 35,4% dos cães analisados evidencia a relevância deste estudo, tendo em vista que o patógeno esteve presente em 74,4% dos casos de coinfeção e 72,7% das multinfecções. A importância desses achados se dá principalmente pela forma que essa doença pode se apresentar, variando desde manifestações assintomáticas a uma variedade de sinais clínicos inespecíficos, além do caráter crônico e debilitante que pode favorecer infecções simultâneas por outros agentes (Baneth, 2011).

Estudos como o de Fonseca et al. (2022) relataram a ocorrência de infecção por *H. canis* em 11,8% (18/153) dos cães domiciliados de Jericoacoara (Ceará), utilizando a PCR como método de diagnóstico, assim como Lopes et al. (2019), que relataram a detecção do DNA de *H. canis* em 10% (2/20) dos cães da zona rural de Natal (Rio Grande do Norte). A hepatozoonose canina é mais prevalente em regiões rurais, devido a possibilidade de o patógeno responsável ter um ciclo natural silvestre e maior chance dos mamíferos envolvidos se infestarem pelos vetores (Demoner et al., 2013). O aumento da frequência desse patógeno em áreas urbanas ressalta a necessidade de mais investigações para a compreensão da dinâmica epidemiológica dessa doença nessas localidades.

As consequências nas alterações clínicas em cães coinfectados e multinfectados por *E. canis*, *A. platys*, *H. canis* e *B. vogeli* não são bem esclarecidas na literatura. As diversas combinações de coinfeções e multinfecções relatadas neste estudo reforçam a necessidade de estudos que abordem os aspectos epidemiológicos e clinicopatológicos de cães naturalmente infectados por esses hemoparasitas, já que a associação desses patógenos podem ser responsáveis por potencializar a doença clínica, dificultar o diagnóstico e a instituição de tratamento adequado (Lara et al., 2020).

Ao confrontarmos os resultados da pesquisa direta dos patógenos em esfregaço sanguíneo com aqueles do diagnóstico molecular (Tabela 3), já era esperada uma menor positividade no primeiro método. Embora simples e de fácil execução, a identificação direta do agente em lâmina apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade, que não permite

distinguir diferentes espécies e pode ser influenciada pela experiência do profissional e a fase da doença em que o animal se encontra (Kaewkong et al., 2014).

Patógenos identificados à hematoscopia e não confirmados ao diagnóstico molecular podem ser decorrentes de inclusões intracelulares inespecíficas. Essas inclusões em células sanguíneas muitas vezes estão relacionadas à ativação celular em processos inflamatórios, que podem ser confundidas com outros hemoparasitas (Ferreira et al., 2007). Além disso, não podemos descartar a possibilidade da infecção por outros organismos da ordem Rickettsiales, espécies de piroplasmas e *Hepatozoon* spp. que não foram testados nesta pesquisa. O nível de parasitemia também deve ser considerado em casos de ausência de amplificação à PCR (Gomes et al., 2016), sendo recomendado outras variações dessa técnica molecular como a reação em cadeia polimerase nested (nPCR) e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) nesses casos, por apresentarem maior sensibilidade de diagnóstico (Rufino et al., 2013).

Para a caracterização genotípica de microrganismos por meio de sequenciamento genético, recomenda-se a utilização de genes que mantêm alto grau de conservação dentro do gênero avaliado e que apresentem sequências de nucleotídeos longas. O gene 16S rRNA utilizado neste estudo para caracterizar filogeneticamente as bactérias *E. canis* e *A. platys* é altamente conservado com baixas frequências de mutação, no entanto, não é o gene indicado para observar variações genéticas dentro de cada espécie, mas apresenta grande aplicação para a distinção entre espécies (Dumler et al., 2001). Este fato também foi observado nesta pesquisa, demonstrado pela alta similaridade entre as diferentes cepas descritas mundialmente com as de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* provenientes deste estudo.

A partir do sequenciamento parcial do gene 18S rRNA que é utilizado para estudos evolutivos de *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. (Pinyoowong et al., 2008), foi possível observar grande similaridade das amostras de *H. canis* e *B. vogeli* obtidas na cidade de Mossoró, localizada no seminário brasileiro, com amostras de referência para essas espécies de outras regiões do Brasil e do mundo. Apesar desse gene ser o mais estudado para os agentes em questão, ele apresenta algumas limitações para estudos moleculares e filogenéticos devido ao tamanho das sequências geradas serem pequenos, o que pode impossibilitar uma caracterização filogenética mais detalhada a depender da aplicação (Gomes et al., 2016; Modrý et al., 2017).

A presença de picos duplos na análise cromatográfica de algumas das sequências de *H. canis* que não foram utilizadas para a análise filogenética neste estudo podem sugerir uma possível coinfeção por diferentes isolados, no entanto, é necessário utilizar a técnica de clonagem molecular para caracterizar adequadamente essas sequências.

Os resultados das análises moleculares realizadas neste trabalho representam uma grande contribuição para o conhecimento da etiologia e distribuição geográfica de *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* e *H. canis* no nordeste brasileiro, tendo em vista a ausência de publicações prévias que forneçam dados sobre a caracterização molecular desses patógenos na região estudada.

5. Conclusões

Este foi o primeiro e o mais extenso trabalho a utilizar a Reação em Cadeia da Polimerase como método de diagnóstico da infecção por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, além de concomitantemente caracterizar filogeneticamente esses agentes, no estado do Rio Grande do Norte.

Foi possível evidenciar uma elevada frequência desses hemoparasitas na população estudada, sendo *E. canis* o patógeno de maior ocorrência, seguido por *H. canis*, *A. platys*, *B. vogeli*, com animais frequentemente infectados por diferentes espécies de bactérias e protozoários de forma simultânea, demonstrando a necessidade de investigação de múltiplos patógenos transmitido por *R. sanguineus* s.l. no diagnóstico de doenças transmitidas por este carrapato em regiões endêmicas.

As diversas combinações de coinfeções e multinfecções relatadas neste estudo reforçam a necessidade de vigilância e medidas preventivas adequadas para garantir a saúde desses animais, já que a associação desses patógenos podem exacerbar as alterações clínicas, dificultar a instituição de tratamento adequado para cada espécie envolvida e piorar o prognóstico do paciente. Ainda, o diagnóstico e tratamento precoces e precisos são essenciais para reduzir a frequência de cães infectados, os quais podem ser fonte de infecção para outros carrapatos vetores, favorecendo a transmissão das doenças.

Aprovação ética

O trabalho com animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Parecer Nº 25/2022).

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza (Laboratório de Diagnóstico Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE) por ter gentilmente cedido as amostras utilizadas como controles-positivos para as PCR neste estudo.

Referências

- BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 3–11, 8 set. 2011.
- BEUGNET, F.; MOREAU, Y. Babesiosis. **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 2, p. 627–639, ago. 2015.
- BITTENCOURT, J. et al. Ocorrência de *Babesia* sp, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães domiciliados, em dois municípios do estado do Espírito Santo - Brasil. **Vet. zootec**, p. 1–9, 2022.
- BOUZOURAA, T. et al. Implication, clinical and biological impact of vector-borne haemopathogens in anaemic dogs in France: a prospective study. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 9, p. 510–518, set. 2017.
- BRAGA, J. F. V. et al. Molecular, serological, and parasitological detection of *Babesia vogeli* in dogs in the state of Piauí, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6Supl2, p. 3035–3044, 30 set. 2019.
- BUDDHACHAT, K. et al. Simultaneous differential detection of canine blood parasites: Multiplex high-resolution melting analysis (mHRM). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, p. 101370, 1 maio 2020.
- BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141–146, 2004.
- CEVIDANES, A. et al. Co-infection patterns of vector-borne zoonotic pathogens in owned free-ranging dogs in central Chile. **Veterinary Research Communications**, v. 47, n. 2, p. 575–585, 1 jun. 2023.
- COSTA, A. P. DA et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 28–35, mar. 2015.

DANTAS-TORRES, F. et al. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 195, 21 abr. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437–446, out. 2012.

DEMONER, L. C.; ANTUNES, J. M. A. P.; O'DWYER, L. H. Hepatozoonose canina no Brasil: Aspectos da biologia e transmissão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, p. 193-202, 2013.

DI CATALDO, S. et al. Mapping the distribution and risk factors of Anaplasmatidae in wild and domestic canines in Chile and their association with *Rhipicephalus sanguineus* species complex lineages. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 12, n. 5, p. 101752, set. 2021.

DUARTE, S. C. et al. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 16–20, 25 mar. 2008.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and “HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. Pt 6, p. 2145–2165, nov. 2001.

FERREIRA, R. F. et al. **Anaplasma platys Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests**. 2007. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Anaplasma-platys-Diagnosis-in-Dogs%3A-Comparison-and-Ferreira-Guimar%C3%A3es/31024df605fdca2e0aee20bf2c49a44a3a615db4>>. Acesso em: 12 fev. 2024

FONSÊCA, A. D. V. et al. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, p. e021321, 28 fev. 2022.

FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; CONTRERAS, M. Prevention and control strategies for ticks and pathogen transmission. **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 1, p. 249–264, abr. 2015.

GOMES, L. DE A. et al. Molecular analysis reveals the diversity of Hepatozoon species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1061–1066, out. 2016.

GONÇALVES, L. R. et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 407–412, set. 2014.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171–180, abr. 2013.

- GUIMARÃES, M. DE C. N. et al. Ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos em cães domésticos em Belém do Pará, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, n. 4, p. 323–329, 2021.
- HAN, B. A.; KRAMER, A. M.; DRAKE, J. M. Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 565–577, jul. 2016.
- HEINRICH, C. E. et al. Utilização do método de Processo Analítico Hierárquico (AHP) para análise das estradas rurais do município de Marechal Cândido Rondon – PR. **DRd - Desenvolvimento Regional em debate**, v. 11, p. 182–203, 30 ago. 2021.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S3-14, 2004.
- KAEWKONG, W. et al. High throughput pyrosequencing technology for molecular differential detection of *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in canine blood samples. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 381–385, jun. 2014.
- KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, jun. 2017.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.
- KAUR, N. et al. Development and application of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105713, dez. 2020.
- KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1946–1955, 1 dez. 2012.
- LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, n. 1, p. 17–32, jun. 2005.
- LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. DE C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 30, p. 24–32, 2001.
- LARA, B. et al. Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 488, 19 jun. 2020.
- LEMO FILHO, L. C. A. ESPÍNOLA SOBRINHO, J.; OLIVEIRA JÚNIOR., H. S. Clima e Recursos Hídricos na Bacia Hidrográfica do Apodi-Mossoró-RN. In: CARVALHO, R. G. (Org.). **Rio Apodi Mossoró: Meio Ambiente e Planejamento**. Mossoró/RN. EDUERN, 2021. p. 37-62.
- LIMA, E. R. DE et al. Aspectos clínicos e laboratoriais em cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* / Clinical and laboratory aspects in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3471–3484, 30 jul. 2021.

- LOPES, M. G. et al. Ticks, rickettsial and ehrlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife**, v. 7, n. 3, p. 380–385, dez. 2018.
- LOPES, M. G. et al. Occurrence of Ehrlichia canis and Hepatozoon canis and probable exposure to Rickettsia amblyommatis in dogs and cats in Natal, RN. **Rev. bras. parasitol. vet**, p. 151–156, 2019.
- MALHEIROS, J. et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 893–900, jul. 2016.
- MALIK, M. I. et al. Molecular detection of Ehrlichia canis in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). **Veterinary Medicine and Science**, v. 4, n. 2, p. 126–132, maio 2018.
- MASSETTI, L. et al. High-throughput multiplex qPCRs for the surveillance of zoonotic species of canine hookworms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008392, 15 jun. 2020.
- MATEI, I. A. et al. Molecular detection of Anaplasma platys infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 157, 16 mar. 2016.
- MELO, A. L. T. et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, mar. 2016.
- MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 1 maio 2020.
- MODRÝ, D. et al. A Review of Methods for Detection of Hepatozoon Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 17, n. 1, p. 66–72, jan. 2017.
- MONGRUEL, A. C. B. et al. Molecular detection of vector borne pathogens in anemic and thrombocytopenic dogs in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 505–513, 14 nov. 2018.
- MOVILLA, R. et al. Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 131, 13 mar. 2017.
- DE OLIVEIRA, G. M. B. et al. Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101409, jul. 2020.
- PIANTEDOSI, D. et al. Seroprevalence and risk factors associated with Ehrlichia canis, Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi sensu lato, and D. immitis in hunting dogs from southern Italy. **Parasitology Research**, v. 116, n. 10, p. 2651–2660, 1 out. 2017.
- PINYOOWONG, D. et al. Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular**

Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, v. 8, n. 4, p. 433–438, jul. 2008.

ROTONDANO, T. E. DE F. et al. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 1, p. 52–58, 2015.

ROTONDANO, T. E. DE F. et al. *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 211–215, 22 jun. 2017.

RUCKSAKEN, R. et al. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. **Veterinary World**, v. 12, n. 5, p. 700–705, maio 2019.

RUFINO, C. P. et al. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 13, n. 12, p. 846–850, dez. 2013.

SCHNITTGER, Leonhard et al. *Babesia*: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788–1809, 2012.

SILVA, G. R. S. DA et al. Detecção molecular de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. em *Rhipicephalus sanguineus* e cães do Centro de Controle de Zoonoses de Belém, estado do Pará. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e475101321392–e475101321392, 19 out. 2021.

TANIKAWA, A. et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 474–477, jun. 2013.

TURCHETTI, A. P. **Perfil de expressão gênica e níveis de citocinas em macrófagos caninos com diferentes graus de susceptibilidade à infecção por *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária - UFMG. 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-9STPFU>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.58-62, 2004.

VIEIRA, E. M. et al. BABESIOSE CANINA: ASPECTOS HEMATOLÓGICOS E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO. **Revista Unimontes Científica**, v. 23, n. 1, p. 1–16, 18 jun. 2021.

YABSLEY, M. J.; SHOCK, B. C. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 18–31, 1 dez. 2013.

CAPÍTULO 2:

**Fatores epidemiológicos e clinicopatológicos associados a
infecção por múltiplos patógenos transmitidos por *R. sanguineus*
s. l. em cães naturalmente infectados no Semiárido Nordestino,
Brasil**

Bruno Vinícios Silva de Araújo; Gabriela Linhares Leite; Michelly Fernandes de Macedo;
João Marcelo Azevedo de Paula Antunes; Juliana Fortes Vilarinho Braga

Submetido ao periódico Ticks and Tick-Borne Diseases
Fator de impacto: 3.2 (2022) – Qualis CAPES: A1

Fatores epidemiológicos e clinicopatológicos associados a infecção por múltiplos patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s. l. em cães naturalmente infectados no Semiárido Nordestino, Brasil

Bruno Vinícios Silva de Araújo; Gabriela Linhares Leite; Michelly Fernandes de Macedo; João Marcelo Azevedo de Paula Antunes; Juliana Fortes Vilarinho Braga

Resumo

Os cães domésticos são susceptíveis à infecção por vários agentes transmitidos por ixodídeos que albergam e transmitem grande variedade de patógenos, como os protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, e bactérias como *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, os quais são responsáveis por diversas manifestações clínicas nos hospedeiros infectados. Raros são os dados sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos de cães coinfectados e multi-infectados no território brasileiro. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi determinar o perfil epidemiológico e clinicopatológico de cães monoinfectados, coinfectados e multi-infectados por *A. platys*, *E. canis*, *B. vogeli* e/ou *H. canis*. Para isso, cães de população hospitalar sob suspeita clínica laboratorial de hemoparasitoses foram selecionados e amostras sanguíneas foram coletadas para determinação do hematócrito e contagem de plaquetas. Foram considerados animais monoinfectados, coinfectados e multi-infectados aqueles em que houve detecção de um, dois e três ou mais patógenos, respectivamente. Para correlacionar as variáveis epidemiológicas, clinicopatológicas e o tipo de infecção foram utilizados os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher e a magnitude das associações foi estimada pelo *Odds ratio* seguida por regressão logística multinomial. Esta é a primeira pesquisa a analisar as características epidemiológicas e clinicopatológicas dos cães naturalmente infectados por esses patógenos, correlacionando com os diferentes tipos de infecção, considerando o número de patógenos envolvidos. Os cães com histórico de carrapato possuíam 3,41 vezes mais chance de estarem coinfectados em comparação àqueles que não possuíam esse histórico. Multi-infecção (90,9%) e coinfecção (84,6%) foram mais frequentes em animais que não faziam uso de medicação carrapaticida, em comparação aos monoinfectados (56,8%) e não infectados (56%). Os indivíduos que possuíam histórico de uso de carrapaticidas mostraram-se menos propensos a infecções. Os indivíduos machos apresentaram maior chance de se infectar em comparação a fêmeas. Cães com sinais clínicos de epistaxe, hiporexia ou anorexia, onicogribose, desidratação e presença de ectoparasitas apresentaram mais chance de estarem multi-infectados em comparação aos outros tipos de infecção. Dentre as variáveis hematológicas analisadas, a trombocitopenia apresentou alta prevalência em todos os tipos de infecção, tendo os cães multinfectedos 16,3 vezes mais chance de apresentarem esta condição, e cães coinfectados 2,11 vezes mais chance de apresentarem anemia. Os achados deste estudo permitiram concluir que as variáveis epidemiológicas histórico de ectoparasitismo e o uso de medicação carrapaticida foram influenciadas a depender do tipo de infecção e os animais multi-infectados e coinfectados apresentaram um

maior número de alterações clínicas inespecíficas, acompanhadas de alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia. Em áreas com condições climáticas favoráveis ao *R sanguineus* s.l., recomenda-se a investigação de um conjunto de patógenos envolvidos nas DTV, tendo em vista que as alterações clínicas e laboratoriais relatadas podem ser comuns nos diferentes tipos de infecção. Esses achados contribuem para um melhor entendimento do perfil epidemiológico e clinicopatológico dos cães infectados por um ou múltiplos patógenos transmitidos por carrapatos, permitindo uma melhor compreensão da dinâmica dessas doenças no semiárido Nordeste.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*; *Babesia vogeli*; *Ehrlichia canis*; *Hepatozoon canis*; Carrapatos; DTV.

1. Introdução

As doenças transmitidas por vetores (DTV) representam um importante grupo de doenças que acometem cães e humanos (Who, 2017), sendo o carrapato um dos principais artrópodes envolvidos na disseminação dessas enfermidades (Melo et al., 2016; Mahachi et al., 2020), principalmente em áreas altamente endêmicas, como a América Latina (Bonilla-Aldana et al., 2022).

A emergência e reemergência das DTV estão ligadas a fatores de desordem ecológica, como as alterações climáticas, perda da biodiversidade e urbanização, que provocam a redistribuição dos vetores, expansão dos seus limites geográficos e aumento da acessibilidade a determinados nichos ambientais, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Han et al., 2016; Solano-Gallego et al., 2016; Rocklöv; Dubrow, 2020).

O cão doméstico é susceptível à infecção por vários agentes transmitidos por ixodídeos que carregam e transmitem grande variedade de vírus, bactérias e protozoários (Zhang et al., 2017; Qiu et al., 2018), como as bactérias *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* e os protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, hemoparasitos frequentemente encontrados nesses animais no Brasil (Dantas-Torres e Otranto, 2014; Malheiros et al., 2016; Sousa et al., 2017; Vieira et al., 2018), sendo responsáveis por diversas manifestações clínicas nos hospedeiros infectados (Bouzouraa et al., 2017).

Os sinais clínicos variam de infecções agudas potencialmente fatais a doenças crônicas recrudescentes que podem ser transmitidas por esses hospedeiros caninos durante

toda a sua vida (Kidd, 2019). Segundo Cevidanes et al. (2023), febre, palidez de mucosas, anorexia e perda de peso são os sinais clínicos comumente apresentados pelos animais infectados, além de alterações hematológicas como anemia, trombocitopenia e, ocasionalmente leucopenia, tendo alterações mais exacerbadas à medida que múltiplas infecções acometem esses hospedeiros.

Essas hemoparasitoses causadas por *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* e *H. canis* representam um desafio diagnóstico importante na clínica médica veterinária, devido os sinais clínicos induzidos serem semelhantes e agravados em situações de coinfeção, reduzindo a eficácia do tratamento e prejudicando o prognóstico (Rucksak et al., 2019; Guimarães et al., 2021).

Em cães, a incidência de coinfeções por hemoparasitos aumentou principalmente em países tropicais e subtropicais, podendo chegar a 36% (Boonhoh et al., 2023). No Brasil, vários estudos evidenciaram a presença de cães infectados por patógenos transmitidos por carrapatos (Dantas-Torres et al., 2012; Braga e Silva, 2013; Bernardino et al., 2016; Gomes et al., 2016; Soares et al., 2017; Sousa et al., 2017; Braga et al., 2019; Guimarães et al., 2021; Fonsêca et al., 2022), no entanto, raros são os dados sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos de cães coinfectados e multi-infectados por esses agentes. Diante isso, o objetivo do presente estudo foi determinar a associação entre o perfil epidemiológico e clinicopatológico de cães naturalmente monoinfectados, coinfectados e multinfectedados por *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e/ou *Hepatozoon canis*.

2. Material e métodos

2.1 Área do estudo e definição da amostra

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Parecer N° 25/2022) e a coleta do material biológico realizada somente após a assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido pelos tutores.

O estudo foi realizado no município de Mossoró (5°11'15''S, 37°20'39''W), Rio Grande do Norte, que possui clima semiárido, tipo Aw', segundo a classificação climática de

W. Köppen, caracterizado por um clima tropical chuvoso com inverno seco e estação chuvosa no verão, apresentando temperatura média de 27,4 °C, com precipitação pluviométrica anual irregular e umidade relativa média do ar de aproximadamente 68,9% (Lemos Filho; Espínola; Oliveira Júnior, 2021).

O cálculo amostral para populações infinitas seguiu recomendações propostas por Heinrich et al., (2021) pela fórmula $n = Z^2 \alpha / 2 \cdot P(1-P) / e^2$, considerando o grau de confiança (Z) de 1,96, probabilidade de sucesso (P) de 50% e erro amostral (e) de 9%.

Como critério de inclusão a população de estudo envolveu cães sob suspeita clínica laboratorial de infecção por *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e/ou *Hepatozoon canis* provenientes de hospitais públicos e populares, independente do sexo, raça e idade. Desses cães, 81 estavam monoinfectados, 39 coinfectados e 11 multi-infectados, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase como método de diagnóstico confirmatório (dados em fase de pré-publicação) (Araújo et al., 2024).

2.2 Dados epidemiológicos e sinais clínicos

No momento da anamnese, os tutores foram questionados sobre o acesso do animal à rua, uso de método(s) de controle de ectoparasitos, convivência do cão com outros animais, histórico vacinal e histórico de ectoparasitas. No exame físico foram avaliadas as mucosas oculares para identificação de anemia, icterícia e hemorragia, tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura corporal e presença de ectoparasitas. Essas informações e outras alterações clínicas apresentadas pelo animal no momento do atendimento clínico foram preenchidas em ficha clínico-epidemiológica individual, onde também constava a suspeita clínica, raça, sexo e idade do cão.

2.3 Coleta de sangue e análise hematológica

Para análise hematológica, foram coletados 0,5 ml de amostra sanguínea por venopunção cefálica ou jugular mediante antissepsia adequada e acondicionada em tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os parâmetros considerados na pesquisa, HCT (hematócrito) e PLT (plaquetas), foram determinados pelo analisador hematológico automático Hemacounter Vet 60-RT 7600® (Hemogram, Brasil), sendo a contagem de plaquetas confirmada por meio de esfregaços sanguíneos corados pela técnica de panótico

rápido, conforme Kerr (2003). Os valores de referência adotados foram estabelecidos por Rizzi et al. (2010).

2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos em frequência simples e porcentagem obtidos através do programa estatístico SAS System for Windows 9.0 (SAS Inst., Cary, Estados Unidos). Para verificar a associação das diferentes variáveis estudadas frente a infecção foram utilizados os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher, sendo este utilizado quando a frequência esperada foi inferior a 5. A magnitude das associações foi estimada pelo *Odds Ratio* (OR) com intervalo de 95% de confiança (IC95%) seguida por regressão logística multinomial para verificar os múltiplos fatores associados a infecção. Para essa análise, a categoria “negativo” foi utilizada como referência. Inicialmente, participaram do modelo multivariado as variáveis estatisticamente associadas ao desfecho na análise univariada com valor de $p < 0,20$, permanecendo no modelo final somente as associadas com valor de $p < 0,05$. O teste de Hosmer-Lemeshow foi utilizado para verificar a adequação dos modelos logísticos.

3. Resultados

Das sete variáveis epidemiológicas analisadas neste estudo, apenas duas mostraram estar significativamente associadas aos diferentes perfis de infecção, especificamente histórico de ectoparasitismo e uso de medicação carrapaticida. Mais da metade (54,5%, 6/11; $p=0,007$) dos cães multi-infectados e coinfectados (56,4%, 22/39; $p=0,007$) possuíam histórico de ectoparasitismo por carrapatos, e os animais com esse histórico apresentaram 3,68 (IC 1,50 – 9,0) vezes mais chance de estarem coinfectados em comparação àqueles que não possuíam esse histórico (Tabela 1).

Sim	06	54,5	3,41 (0,89 – 13,10)	22	56,4	3,68 (1,50 – 9,0)	24	29,6	1,19 (0,54 – 2,64)	13	26,0	0,007*
Não	05	45,5	1	17	43,6	1	57	70,4	1	37	74,0	
Histórico de uso de medicação carrapaticida												
Sim	01	9,1	0,12 (0,01 – 1,07)	06	15,4	0,23 (0,08 – 6,51)	35	43,2	0,96 (0,47 – 1,97)	22	44,0	0,002*
Não	10	90,9	1	33	84,6	1	46	56,8	1	28	56,0	

*Significância estatística ($p < 0,05$ – Exato de Fisher). OR(IC95%) = *Odds ratio* (Intervalo de confiança 95%); Categoria “Negativo” foi utilizada como referência; 1 = Variável de comparação.

O uso de produtos carrapaticidas também demonstrou estar associado ao tipo de infecção, onde a maioria dos cães que não faziam uso dessas substâncias encontrava-se multi-infectados (90,9%, 10/11; $p = 0,002$) e coinfectados (84,6%, 33/39; $p = 0,002$), em comparação aos monoinfectados (56,8%, 46/81; $p = 0,002$) e não infectados (56%, 28/50; $p = 0,002$). Animais que possuíam histórico de uso de medicação carrapaticida mostraram-se menos frequentemente infectados pelos agentes pesquisados (Tabela 1).

O teste de Qui-quadrado e o exato de Fisher utilizados para analisar o conjunto das variáveis se complementaram com o OR, permitindo estabelecer a intensidade da relação entre essas variáveis e os tipos de infecção, por meio de uma análise bivariada. Na tabela 1, mesmo a variável sexo não apresentando significância estatística, os machos apresentaram 2,85 (IC 0,73 – 11,06) mais chance de estarem multi-infectados em comparação às fêmeas. A razão de chance mais elevada para essa variável em animais coinfectados (1,39, IC 0,59 – 3,27) e monoinfectados (1,59, IC 0,77 – 3,26) também existiu, no entanto, menor em comparação a multi-infecção.

Das variáveis clinicopatológicas observadas na Tabela 2, apenas a frequência de desidratação e onicogrifose variaram a depender do tipo de infecção. A desidratação foi mais frequentemente observada em cães multi-infectados (54,5%, 6/11; $p = 0,001$) e coinfectados (35,9%, 14/39; $p = 0,001$) quando comparadas aos não infectados (14%, 7/50; $p = 0,001$) e monoinfectados (12,3%, 10/81; $p = 0,001$), assim como a onicogrifose, mais frequente em indivíduos multi-infectados (18,2%, 2/11; $p = 0,028$) em comparação a não infectados (2%, 1/50; $p = 0,028$) e monoinfectados (1,2%, 1/81; $p = 0,028$).

Tabela 2. Frequência das alterações clínico patológicas e sua correlação com os tipos de infecções em cães naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* atendidos no município de Mossoró/RN, 2023.

[illegible]

Sim	0	0,0		0	0,0	-	01	1,2	-	0	0,0	1,0
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	80	98,8	1	49	100,0	
Hemoglobinúria												
Sim	0	0,0	-	0	0,0	-	03	3,7	-	0	0,0	0,439
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	78	96,3	1	50	100,0	
Claudicação												
Sim	1	9,1	1,56 (0,14 – 16,65)	03	7,7	1,30 (0,24 – 6,85)	02	2,5	0,39 (0,64 – 2,46)	03	6,0	0,344
Não	10	90,9	1	36	92,3	1	79	97,5	1	47	94,0	
Onicogrifose												
Sim	02	18,2	10 (0,89 – 133,1)	0	0,0	-	01	1,2	0,61 (0,036 – 10,01)	01	2,0	0,028*
Não	09	81,8	1	39	100,0	1	80	98,8	1	49	98,0	
Mucosas hipocoradas												
Sim	03	27,3	0,797 (0,18 – 3,41)	15	38,5	1,32 (0,55 – 3,19)	14	17,3	0,44 (0,19 – 1,01)	16	32,0	0,057
Não	08	72,7	1	24	61,5	1	67	82,7	1	34	68,0	
Icterícia												
Sim	0	0,0	-	0	0,0	-	02	2,5	-	0	0,0	0,751
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	79	97,5	1	11	100,0	
Edema												
Sim	0	0,0	-	0	0,0	-	01	1,2	-	0	0,0	1,0
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	80	98,8	1	11	100,0	
Petéquias												
Sim	0	0,0	-	0	0,0	-	01	1,2	-	0	0,0	1,0
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	80	98,8	1	11	100,0	
Epistaxe												
Sim	01	9,1	4,90 (0,28 – 85,0)	04	10,3	5,60 (0,60 – 52,27)	5	6,2	3,22 (0,36 – 28,4)	01	2,0	0,302

Não	10	90,9	1	35	89,7	1	76	93,8	1	49	98,0	
Febre												
Sim	0	0,0	-	03	7,7	0,75 (0,16 – 3,35)	09	11,1	1,12 (0,35 – 3,57)	05	10,0	0,863
Não	11	100,0	1	36	92,3	1	72	88,9	1	45	90,0	
Conjuntivite												
Sim	0	0,0	-	03	7,7	0,75 (0,16 – 3,35)	08	9,9	0,98 (0,30 – 3,20)	05	10,0	0,931
Não	11	100,0	1	36	92,3	1	73	90,1	1	45	90,0	
Esplenomegalia												
Sim	0	0,0	-	0	0,0	-	01	1,2	0,30 (0,02 – 3,39)	02	4,0	0,541
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	80	98,8	1	48	96,0	
Hepatomegalia												
Sim	0	0,0	-	01	2,6	0,63 (0,05 – 7,23)	0	0,0	-	02	4,0	0,289
Não	11	100,0	1	38	97,4	1	81	100,0	1	48	96,0	
Linfadenomegalia												
Sim	04	36,4	1,21 (0,31 – 4,75)	20	51,3	2,23 (0,94 – 5,31)	24	29,6	0,89 (0,41 – 1,91)	16	32,0	0,126
Não	07	63,6	1	19	48,7	1	57	70,4	1	34	68,0	

MEs*Significância estatística ($p < 0,05$ – Exato de Fisher). OR(IC95%) = *Odds Ratio* (Intervalo de confiança 95%); Categoria “Negativo” foi utilizada como referência; 1 = Variável de comparação.

Pacientes que apresentavam onicogrifose (10,0, IC 0,89 – 133,1), desidratação (7,37, IC 1,76 – 30,82), epistaxe (4,90, IC 0,28 – 85,0), hiporexia ou anorexia (4,74, IC 1,11 – 20,15) e presença de ectoparasitas (4,19, IC 0,93 – 18,69) possuíam mais chance de estarem multi-infectados, e os que apresentavam epistaxe (5,60, IC 0,60 – 52,27), desidratação (3,44, IC 1,22 – 9,66) e presença de ectoparasitos (2,88, IC 0,95 – 8,67) tinham maior chance de estarem coinfectados. As monoinfecções estavam relacionadas a uma maior chance em cães que apresentavam ectoparasitas (1,53, IC 0,54 – 4,28) e epistaxe (3,22, IC 0,36 – 28,4) (Tabela 2). Apesar de não ter havido diferença estatística entre os tipos de infecções quanto às alterações sistêmicas (Tabela 3, material suplementar), foi observada elevada frequência (63,6%, 7/11; $p = 0,901$) de alterações digestivas em animais multi-infectados.

Dentre as variáveis hematológicas analisadas, trombocitopenia apresentou alta frequência em todos os tipos de infecção, chegando a uma OR de 16,3 (IC 3,48 – 77,0) em cães multi-infectados, 7,95 (IC 1,70 – 4,20) em animais coinfectados e 5,16 (IC 2,07 – 12,84) em monoinfectados. Cães com anemia possuíam 2,11 (IC 0,90 – 4,95) mais razão de chance de estarem coinfectados, presente em 56,4% (22/39; $p = 0,336$) dos casos nesse tipo de infecção (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência e correlações entre alterações hematológicas e tipos de infecções parasitárias causadas por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães atendidos no município de Mossoró/RN, 2023.

Variáveis	Multi-infecção			Coinfecção			Monoinfecção			Negativo		p-valor
	Freq.	%	OR (IC95%)	Freq.	%	OR (IC95%)	Freq.	%	OR (IC95%)	Freq.	%	
Anemia												
Sim	04	36,4	0,932 (0,24 – 3,61)	22	56,4	2,11 (0,90 – 4,95)	35	43,2	1,24 (0,60 – 2,55)	19	38,0	0,336
Não	07	63,6	1	17	43,6	1	46	56,8		31	62,0	
Trombocitopenia												
Sim	08	72,7	16,3 (3,48 – 77,0)	22	56,4	7,95 (1,70 – 4,20)	37	45,7	5,16 (2,07 – 12,84)	07	14,0	<0,001**
Não	03	27,3	1	17	43,6	1	44	54,3	1	43	86,0	

Significância estatística ($p < 0,05$ – Exato de Fisher). OR(IC95%) = *Odds Ratio* (Intervalo de confiança 95%); Categoria “Negativo” foi utilizada como referência; 1 = Variável de comparação.

Após a realização do teste de Hosmer-Lemeshow para verificar se o modelo estava ajustado, foi possível observar um impacto significativo das variáveis nos tipos de infecção estudados (Tabela 5).

Tabela 5. Análise multivariada multinomial* dos fatores associados aos tipos de infecção por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* atendidos no município de Mossoró/RN, 2023.

Níveis de infecção	OR (IC95%)	p-valor
Multinfecção**		
Trombocitopenia	14,21 (2,92 – 69,17)	0,001
Histórico de carrapato	4,54 (1,10 – 19,77)	0,044
Histórico de usar medicação contra carrapato	0,09 (0,01 – 0,81)	0,032
Coinfecção***		
Trombocitopenia	6,84 (2,37 – 19,78)	<0,001
Histórico de carrapato	4,72 (1,72 – 12,95)	0,003
Histórico de usar medicação contra carrapato	0,16 (0,05 – 0,50)	0,002
Monoinfecção¥		
Trombocitopenia	5,17 (2,10 – 12,93)	<0,001
Histórico de carrapato	-	
Histórico de usar medicação contra carrapato	-	

* Categoria “Negativo” utilizada como base para análise; **Teste de Hosmer e Lemeshow: $\chi^2 = 3,03$; $p=0,694$;

***Teste de Hosmer e Lemeshow: $\chi^2 = 4,39$; $p=0,494$; ¥ Hosmer e Lemeshow não calculado.

4. Discussão

Hemoparasitas dos gêneros *Anaplasma*, *Babesia*, *Ehrlichia*, e *Hepatozoon* possuem ampla distribuição no território brasileiro (Vieira et al., 2013; Makino et al., 2016; Pacheco et al., 2021; Bittencourt et al., 2022; Fonsêca et al., 2022), causando graves problemas de saúde (Gallego et al., 2023), com morbidade e mortalidade significativas (Buddhachat et al., 2020). No entanto, poucos são os estudos que abordam o impacto dessas infecções em indivíduos coinfectados ou multi-infectados. Esta é a primeira pesquisa a analisar as características epidemiológicas e clinicopatológicas dos cães naturalmente infectados por esses patógenos, correlacionando com os diferentes tipos de infecção, considerando o número de patógenos envolvidos.

Habitualmente, a transmissão dessas doenças está ligada diretamente ao vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l), conhecido como carrapato marrom do cão, o qual apresenta ampla distribuição no Brasil, possuindo assim grande importância epidemiológica na transmissão dessas hemoparasitoses (Gray et al., 2013). O clima semiárido presente na região Nordeste favorece a disseminação dessa espécie de ixodídeo, considerada menos dependente de habitats mais úmidos para a sobrevivência (Yoder et al., 2006; Tanikawa et al., 2013).

Cevidanes et al. (2023) sugerem que o risco de infecção por hemoparasitas está mais associado à abundância do carrapato do que apenas à sua presença. Dessa forma, o ambiente favorável a esse vetor aumenta as chances dos cães se infestarem, o que consequentemente eleva a probabilidade de serem expostos a hemoparasitas (Costa-Júnior et al. 2013; Piantedosi et al. 2017; Di Cataldo et al. 2021), o que corrobora com os resultados deste estudo, onde cães com histórico de carrapatos apresentaram maior prevalência e chance de infecção para mais de um agente.

O local de estudo, por possuir um clima tropical chuvoso com inverno mais seco e estação chuvosa no verão (Lemos Filho; Espínola; Oliveira Júnior, 2021) permite um ambiente ideal para a proliferação do *Rhipicephalus sanguineus* s.l e, consequentemente, maior razão de chance dos animais se coinfectarem (OR 3,68; IC 1,50 – 9,0) e multi-infectarem (OR 3,41; IC 0,89 – 13,10). A alta frequência de infecção para mais de um agente pode dificultar o diagnóstico e tratamento dessas enfermidades, particularmente em áreas endêmicas, devido às alterações clínicas observadas nas diferentes DTV serem semelhantes (Guimarães et al., 2021), o que ressalta a importância de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para auxiliar no diagnóstico confirmatório, permitindo o tratamento adequado.

Neste estudo, foi observada uma maior razão de chance de infecção em cães machos. Diferenças entre os sexos, com maior prevalência desses agentes em machos, também foram evidenciados em outros trabalhos, possivelmente por esses animais terem mais acesso à rua, sendo mais expostos a vetores e, consequentemente, à infecção por hemoparasitas (Souza et al., 2010; Maksimović et al., 2022; Tadesse et al., 2023).

O uso de carrapaticidas está sabidamente associado a prevenção de hemoparasitoses em cães (Mctier et al., 2016), no entanto, grupos socioeconômicos mais vulneráveis apresentam um déficit no controle de vetores e uma falta de cuidados veterinários na população canina, o que favorece uma maior prevalência das DTV nesses animais (Temoche et al., 2022; Gallego et al., 2023). Como a nossa população de estudo foi proveniente de hospitais públicos e populares, destinados a tutores com menor poder aquisitivo, o não uso de carrapaticidas nesses animais pode ser devido ao fator socioeconômico mais baixo, o que corrobora com a evidência de cães infectados que não faziam uso de medicações carrapaticidas.

Os cães que apresentaram positividade para os agentes pesquisados mesmo com o uso de medicação carrapaticida, pode ter se dado devido a maioria dos produtos contra carrapatos disponíveis no mercado possuírem ação direta no próprio cão, no entanto, sabe-se que 95% dos carrapatos encontram-se presentes no ambiente, sendo necessário dedetizações periódicas no local habitado por esses animais para um controle adequado (Labruna e Pereira, 2001; Mctier et al., 2016).

Com relação as variáveis clínicas relatadas neste trabalho (Tabela 2), estudos evidenciaram sinais clínicos inespecíficos causados por hemoparasitas em cães monoinfectados, e na sua maioria sem significância estatística (Gonçalves et al., 2014; Malik et al., 2018; Lima et al., 2021; Fonseca et al., 2022), o que dificulta o diagnóstico justamente devido ao caráter amplo e inespecífico dessas alterações. O fato de as alterações estarem mais presentes em animais infectados por mais de um agente, corrobora com trabalhos como o de Lara et al. (2020) e Lima et al. (2021), onde animais coinfectados apresentaram mais alterações clínicas e uma maior gravidade em comparação aos monoinfectados.

Sinais clínicos como desidratação, epistaxe, febre, letargia, inapetência, anorexia, perda de peso, diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, mucosas hipocoradas e linfadenomegalia são comumente relatados na infecção por *E. canis* e *A. platys* (Kaewkong et al., 2014; Aguiar, 2016; Zhang et al., 2017). E, apesar de geralmente a infecção por *H. canis* ser subclínica, as coinfeções com outras hemoparasitoses podem exacerbar as alterações clínicas (Aguiar, 2016; Santos et al., 2018), o que pode explicar as principais alterações relatadas neste estudo (Tabela 2), tendo em vista que os animais incluídos apresentavam uma maior prevalência para *E. canis* em monoinfecções, *E. canis* com *H. canis* em coinfeções e *E. canis* com *A. platys* e *H. canis* em multi-infecções (Araújo et al., 2024, dados em fase de pré-publicação).

Na literatura observa-se vários trabalhos que já relataram esporadicamente coinfeções e multi-infecções por hemoparasitas em cães (Aguilar et al., 2007; Bouzouraa et al., 2017), no entanto, comumente a frequência desses tipos de infecção são baixas e, em sua maioria se resumem apenas a identificação da exposição e/ou infecção por métodos sorológicos e moleculares, respectivamente, não abordando os aspectos clínicos envolvidos. O que ressalta a importância do presente estudo, ao relatar e associar as alterações clínicas observadas em animais monoinfectados, coinfectados e multi-infectados.

Sabe-se que as doenças transmitidas por carrapatos podem afetar direta ou indiretamente os parâmetros hematológicos (Guimarães et al., 2021). A trombocitopenia é um achado comum em animais com hemoparasitoses, devido a vários mecanismos envolvidos, incluindo a destruição de plaquetas por imunomodulação, agregação e sequestro esplênico (Thrall et al., 2015) e, nos casos de infecção por *A. platys*, em consequência da proliferação do patógeno durante a fase inicial da infecção em vários ciclos (Ferreira et al., 2008).

Thongsahuan et al. (2020) em seu estudo relataram contagem de plaquetas 17,63 vezes menor em cães infectados por *E. canis* do que nos animais saudáveis, o que foi indicativo de trombocitopenia, assim como maior risco (OR=15,19) de apresentar números baixos de hemácias. A hepatozoonose também foi associada à anemia no mesmo estudo. Esses achados corroboram com os dados apresentados nesta pesquisa (Tabela 4), tendo em vista a alta frequência de positividade para esses agentes nos animais analisados.

Mesmo a trombocitopenia sendo uma condição frequentemente associada a infecções por *E. canis* (Bhadesiya; Raval, 2015; Wongsawang; Jeimthaweeboon, 2018; Thongsahuan et al., 2020), a elevada frequência e razão de chance da trombocitopenia em todos os tipos de infecção relatadas neste estudo (Tabela 4) ressaltam a necessidade de investigação para as demais hemoparasitoses na presença dessa alteração hematológica, principalmente em áreas endêmicas, onde os animais possuem maior chance de estarem infectados por mais de um agente transmitido por *R. sanguineus* s.l.. Dessa forma, evitando o subdiagnóstico dessas hemoparasitoses em casos de coinfeções e multi-infecções, contribuindo para a instituição de medidas terapêuticas direcionadas a cada agente.

Embora este estudo apresente um número considerável de animais infectados para pelo menos um patógeno, é necessário reconhecer as limitações presentes com relação ao número

de animais coinfectados e multi-infectados, que impossibilitaram a realização de análises multivariadas direcionadas a cada combinação de coinfeções e multi-infeções, buscando traçar um perfil mais detalhado, além da inviabilidade de testagem para outros patógenos transmitidos por vetores, que podem estar relacionados as alterações clínicas analisadas, a exemplo da *Leishmania infantum*.

5. Conclusões

Este foi o primeiro estudo a analisar o perfil epidemiológico e clinicopatológico de cães naturalmente monoinfectados, coinfectados e multi-infectados por patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s.l., especificamente *A. platys*, *B. vogeli*, *E. canis* e *H. canis*. O histórico de ectoparasitismo e o uso de medicação carrapaticida foram influenciadas a depender do tipo de infecção, onde cães apresentaram maior razão de chance de infecção por mais de um agente infeccioso na presença de histórico de ectoparasitas. Esses animais multi-infectados e coinfectados tenderam a apresentar um maior número de alterações clínicas inespecíficas, acompanhadas de alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia, o que ressalta a necessidade de estudos mais amplos envolvendo animais infectados por múltiplos agentes para que possamos traçar um perfil clinicopatológico mais detalhado para cada tipo de infecção.

Em áreas com condições climáticas favoráveis ao *R. sanguineus* s.l., a presença de trombocitopenia não deve conduzir à investigação de apenas um patógeno envolvido nas DTV pesquisadas, mas a um conjunto de agentes, tendo em vista que essa alteração hematológica esteve presente em monoinfeções, coinfeções e multi-infeções, o que contribuirá para instituição de tratamento adequado para cada agente envolvido. O reconhecimento dessas características serve de subsídios para a elaboração de medidas que possibilitam auxiliar no diagnóstico e, conseqüentemente, na instituição de medidas de tratamento, contribuindo para um melhor prognóstico dos casos de DTV em cães nessas regiões.

Aprovação ética

O trabalho com animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Parecer Nº 25/2022).

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza (Laboratório de Diagnóstico Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE) por ter gentilmente cedido as amostras utilizadas como controles-positivos na PCR direcionada aos agentes analisados neste estudo.

Referências

- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.
- AGUIAR, M. A. Hepatozoonose. In: MEGID, J, RIBEIRO, M. G, PAES, A. C. (Org.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, p. 1004-1008, 2016.
- BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 3–11, 8 set. 2011.
- BERNARDINO, M. G. S. et al. Prevalência de hepatozoonose canina no município de Areia, Paraíba, Brasil. **Biotemas**, v. 29, n. 1, p. 175–179, 5 fev. 2016.
- BHADESIYA, C. M.; RAVAL, S. K. Hematobiochemical changes in ehrlichiosis in dogs of Anand region, Gujarat. **Veterinary World**, v. 8, n. 6, p. 713, 2015.
- BITTENCOURT, J. et al. A ocorrência de *Babesia* sp., *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães domiciliados, em dois municípios do Estado do Espírito Santo–Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1-9, 2022.
- BONILLA-ALDANA, D. K. et al. Haematological Alterations Associated with Selected Vector-Borne Infections and Exposure in Dogs from Pereira, Risaralda, Colombia. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 12, n. 24, p. 3460, 8 dez. 2022.
- BOONHOH, W. et al. Hematological analysis of naturally infecting blood parasites in dogs. **Veterinary World**, v. 16, n. 4, p. 681–686, abr. 2023.
- BOUZOURAA, T. et al. Implication, clinical and biological impact of vector-borne haemopathogens in anaemic dogs in France: a prospective study. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 9, p. 510–518, set. 2017.
- BRAGA, J. F. V. et al. Molecular, serological, and parasitological detection of *Babesia vogeli* in dogs in the state of Piauí, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6Supl2, p. 3035–3044, 30 set. 2019.

BRAGA, J. F. V.; SILVA, S. M. M. DE S. Babesiose canina: uma visão geral da doença. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 2, p. 204–213, 2013.

BUDDHACHAT, K. et al. Simultaneous differential detection of canine blood parasites: multiplex high-resolution melting analysis (mHRM). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 3, p. 101370, 2020.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73–86, 5 jan. 2004.

CEVIDANES, A. et al. Co-infection patterns of vector-borne zoonotic pathogens in owned free-ranging dogs in central Chile. **Veterinary Research Communications**, v. 47, n. 2, p. 575–585, 1 jun. 2023.

CHIREK, A. et al. Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 2, p. 112–120, fev. 2018.

COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 3, p. 321–326, 1 maio 2013.

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

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437–446, out. 2012.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 22, 14 jan. 2014.

DI CATALDO, S.; CEVIDANES, A.; ULLOA-CONTRERAS, C et al. Mapping the distribution and risk factors of Anaplasmatidae in wild and domestic canines in Chile and their association with *Rhipicephalus sanguineus* species complex lineages. **Ticks and Tick-Borne Diseases** 12:101752. 2021.

EBERTS, M. D. et al. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 6, p. e86-94, 2011.

FERREIRA, R. F et al. Parâmetros hematológicos em cães positivos e negativos para reação em cadeia da polimerase para *Anaplasma platys* apresentando corpúsculos de inclusão plaquetária. **Revista Internacional de Pesquisa Aplicada em Medicina Veterinária**, v. 6, n. 3, pág. 185-190, 2008.

FONSÊCA, A. D. V. et al. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, p. e021321, 28 fev. 2022.

GALLEGO, M. M. et al. Molecular characterization of Ehrlichia canis and Babesia vogeli reveals multiple genogroups associated with clinical traits in dogs from urban areas of Colombia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 14, n. 2, p. 102111, mar. 2023.

GOMES, L. DE A. et al. Molecular analysis reveals the diversity of Hepatozoon species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1061–1066, out. 2016.

GONÇALVES, L. R. et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 407–412, set. 2014.

GRANICK, J. L.; ARMSTRONG, P. J.; BENDER, J. B. Anaplasma phagocytophilum infection in dogs: 34 cases (2000-2007). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 12, p. 1559–1565, 15 jun. 2009.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171–180, abr. 2013.

GUIMARÃES, M. DE C. N. et al. Ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos em cães domésticos em Belém do Pará, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, n. 4, p. 323–329, 2021.

HAN, B. A.; KRAMER, A. M.; DRAKE, J. M. Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 565–577, jul. 2016.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for The Practicing Veterinarian**, 1997.

HEINRICH, C. E. et al. Utilização do método de Processo Analítico Hierárquico (AHP) para análise das estradas rurais do município de Marechal Cândido Rondon–PR. **Desenvolvimento Regional em debate**, v. 11, p. 182-203, 2021.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. S4, 26 mar. 2009.

KAEWKONG, W. et al. High throughput pyrosequencing technology for molecular differential detection of Babesia vogeli, Hepatozoon canis, Ehrlichia canis and Anaplasma platys in canine blood samples. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 381–385, jun. 2014.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 339-359, 2003.

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

LARA, B. et al. Serologic and Molecular Diagnosis of Anaplasma platys and Ehrlichia canis Infection in Dogs in an Endemic Region. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 488, 19 jun. 2020.

- LEMOS FILHO, L. C. A. ESPÍNOLA SOBRINHO, J.; OLIVEIRA JÚNIOR., H. S. Clima e Recursos Hídricos na Bacia Hidrográfica do Apodi-Mossoró-RN. In: CARVALHO, R. G. (Org.). **Rio Apodi Mossoró: Meio Ambiente e Planejamento**. Mossoró/RN. EDUERN, 2021. p. 37-62.
- LIMA, E. R. DE et al. Aspectos clínicos e laboratoriais em cães naturalmente infectados pela Ehrlichia canis / Clinical and laboratory aspects in dogs naturally infected with Ehrlichia canis. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3471–3484, 30 jul. 2021.
- LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1121–1140, nov. 2010.
- MAHACHI, K. et al. Predominant risk factors for tick-borne co-infections in hunting dogs from the USA. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 247, 13 maio 2020.
- MAKSIMOVIĆ, Z. et al. Seroprevalence of Anaplasma spp. and Ehrlichia spp. and molecular detection of Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma platys in stray dogs in Bosnia and Herzegovina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 2, p. 101875, 1 mar. 2022.
- MALHEIROS, J. et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 893–900, jul. 2016.
- MALIK, M. I. et al. Molecular detection of Ehrlichia canis in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). **Veterinary Medicine and Science**, v. 4, n. 2, p. 126–132, maio 2018.
- MAKINO, H. et al. Ehrlichia canis detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 310-314, 2016.
- MAZEPA, A. W. et al. Clinical presentation of 26 anaplasma phagocytophilum-seropositive dogs residing in an endemic area. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p. 405–412, 2010.
- MCTIER, T. L. et al. Determination of the effective dose of a novel oral formulation of sarolaner (SimparicaTM) for the treatment and month-long control of fleas and ticks on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 222, p. 12–17, 30 maio 2016.
- MELO, A. L. T. et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, mar. 2016.
- MONGRUEL, A. C. B. et al. Molecular detection of vector borne pathogens in anemic and thrombocytopenic dogs in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 505–513, 14 nov. 2018.
- MUNDIM, É. C. DE S. et al. Incidência De Hemoparasitoses Em Cães (canis Familiares) De Rua Capturados Pelo Centro De Controle De Zoonoses (ccz) Da Cidade De Anápolis-Go. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. XII, n. 2, p. 107–115, 2008.

PACHECO, T. A. et al. Serological and molecular survey of tick-borne pathogens among dogs in northern Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 26, n. 4, 2021.

PIANTEDOSI, D. et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *D. immitis* in hunting dogs from southern Italy. **Parasitology Research**, v. 116, n. 10, p. 2651–2660, 1 out. 2017.

QIU, Y. et al. Tick-borne haemoparasites and Anaplasmatidae in domestic dogs in Zambia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 988–995, maio 2018.

RIZZI, T. E. et al. **Normal Hematology of the Dog**. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Schalm's Veterinary Hematology. 6 ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, p. 799-810, 2010.

ROCKLÖV, J.; DUBROW, R. Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. **Nature Immunology**, v. 21, n. 5, p. 479–483, maio 2020.

RUCKSAKEN, R. et al. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. **Veterinary World**, v. 12, n. 5, p. 700–705, maio 2019.

SANTOS, M. A. B. et al. Screening of *Cercopithifilaria bairdii* and *Hepatozoon canis* in ticks collected from dogs of Northeastern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 3, p. 605–608, 25 set. 2018.

SCHNITTGER, L. et al. Babesia: A world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788–1809, 1 dez. 2012.

SOARES, R. et al. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 301–306, mar. 2017.

SOLANO-GALLEGÓ, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 336, 11 jun. 2016.

SOUSA, K. C. M. et al. Anaplasmatidae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 16, p. 3424–3437, dez. 2017.

SOUZA, B. M. P. DA S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 89–93, jun. 2010.

TADESSE, H. et al. Epidemiological Survey on Tick-Borne Pathogens with Zoonotic Potential in Dog Populations of Southern Ethiopia. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 2, p. 102, 3 fev. 2023.

TANIKAWA, A. et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 474–477, jun. 2013.

TEMOCHE, L. F. C. et al. Molecular detection of anaplasmatidae agents on dogs from the department of Piura, Peru. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 51, n. 2, p. 134–144, 23 jun. 2022.

THONGSAHUAN, S. et al. Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2388–2394, nov. 2020.

THRALL, M. A. Morfologia Eritrocitária. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015

VIEIRA, F. DE T. et al. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 249, p. 43–48, 15 jan. 2018.

VIEIRA, R. F. et al. Serological survey of Ehrlichia species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 335–340, 2013.

WONGSAWANG, W; JEIMTHAWEEBOON, S. A. retrospective study of hematology of canine blood parasite infections in Kanchanaburi Province, Thailand. **Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine**, v. 13, n. 2, p. 135-145, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Vector Control Response 2017–2030** Geneva: WHO, 2017.

YODER, J. A. et al. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, Rhipicephalus sanguineus. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 365–372, dez. 2006.

ZHANG, J. et al. Epidemiological survey of ticks and tick-borne pathogens in pet dogs in south-eastern China. **Parasite (Paris, France)**, v. 24, p. 35, 2017.

Material suplementar

Tabela 3 – Frequência e correlações entre alterações clínicas sistêmicas e os tipos de infecções em cães naturalmente infectados por *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* atendidos no município de Mossoró/RN, 2023.

Variáveis	Multi-infecção			Coinfecção			Monoinfecção			Negativo		p-valor
	Freq.	%	OR (IC95%)	Freq.	%	OR (IC95%)	Freq.	%	OR (IC95%)	Freq.	%	
Alterações nervosas												
Sim	01	9,1	0,90 (0,095 – 8,57)	06	15,4	1,63 (0,46 – 5,82)	8	9,9	0,98 (0,30 – 3,20)	05	10,0	0,820
Não	10	90,9	1	33	84,6	1	73	90,1	1	45	90,0	
Alterações oftálmicas												
Sim	01	9,1	0,90 (0,095 – 8,57)	06	15,4	1,63 (0,46 – 5,82)	04	4,9	0,46 (0,11 – 1,83)	05	10,0	0,236
Não	10	90,9	1	33	84,6	1	77	95,1	1	45	90,0	
Alterações digestivas												
Sim	07	63,6	1,61 (0,42 – 6,21)	21	53,8	1,07 (0,46 – 2,49)	46	56,8	1,21 (0,59 – 22,46)	26	52,0	0,901
Não	04	36,4	1	18	46,2	1	35	43,2	1	24	48,0	

Alterações
respiratórias

Sim	01	9,1	0,614 (0,06 – 5,57)	06	15,4	1,11 (0,34 – 3,63)	13	16,0	1,17 (0,43 – 3,17)	07	14,0	0,987
Não	10	90,9	1	33	84,6	1	68	84,0	1	43	86,0	

Alterações urinarias

Sim	0	0,0	-	02	5,1	-	05	6,2	-	0	0,0	0,318
Não	11	100,0	1	37	94,9	1	76	93,8	1	50	100,0	

Alterações
reprodutivas

Sim	0	0,0	-	03	7,7	1,30 (0,24 – 6,85)	09	11,1	1,95(0,50 – 7,61)	03	6,0	0,703
Não	11	100,0	1	36	92,3	1	72	88,9	1	47	94,0	

Alterações
dermatológicas
úlceras

Sim	0	0,0	-	0	0,0	-	05	6,2	0,48 (0,13 – 1,67)	06	12,0	0,119
Não	11	100,0	1	39	100,0	1	76	93,8	1	44	88,0	

Alterações
dermatológicas
nódulos

Sim	0	0,0	-	02	5,1	0,33 (0,06 – 1,69)	02	2,5	0,15 (0,03 – 0,78)	07	14,0	0,064
-----	---	-----	---	----	-----	-----------------------	----	-----	-----------------------	----	------	-------

Não	11	100,0	1	37	94,9	1	79	97,5	1	43	86,0	
Alterações dermatológicas nódulos dois												
Sim	0	0,0	-	01	2,6	0,30 (0,03 – 2,82)	01	1,2	0,14 (0,01 – 1,32)	04	8,0	0,200
Não	11	100,0	1	38	97,4	1	80	98,8	1	46	92,0	
Alterações dermatológicas seborreia												
Sim	0	0,0	-	02	5,1	-	02	2,5	-	0	0,0	0,428
Não	11	100,0	1	37	94,9	1	79	97,5	1	50	100,0	
Alterações dermatológicas prurido												
Sim	1	9,1	-	02	5,1	-	08	9,9	-	0	0,0	0,068
Não	10	90,9	1	37	94,9	1	73	90,1	1	50	100,0	

Significância estatística ($p < 0,05$ – Exato de Fisher). OR(IC95%) = *Odds Ratio* (Intervalo de confiança 95%); Categoria “Negativo” foi utilizada como referência; 1 = Variável de comparação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste estudo proporcionou uma importante contribuição para a comunidade científica, por se tratar do primeiro e mais extenso trabalho a utilizar a PCR como método de diagnóstico da infecção por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, caracterizar filogeneticamente e analisar as características epidemiológicas e clinicopatológicas dos cães naturalmente infectados por esses patógenos, correlacionando com os diferentes tipos de infecção, considerando o número de agentes envolvidos.

Os resultados das análises moleculares e clinicopatológicas permitiram um melhor conhecimento com relação a etiologia e distribuição geográfica dessas hemoparasitoses no Nordeste brasileiro, além de um melhor entendimento do perfil epidemiológico e clinicopatológico de cães em monoinfecção, coinfecção e multi-infecção, permitindo uma melhor compreensão da dinâmica dessas doenças na região.

As diversas combinações de coinfecções e multi-infecções relatadas neste estudo reforçam a necessidade de vigilância e estratégias de prevenção e controle com o intuito de garantir a saúde desses animais, já que a associação desses patógenos podem exacerbar as alterações clínicas, dificultar a instituição de tratamento adequado e piorar o prognóstico do paciente.