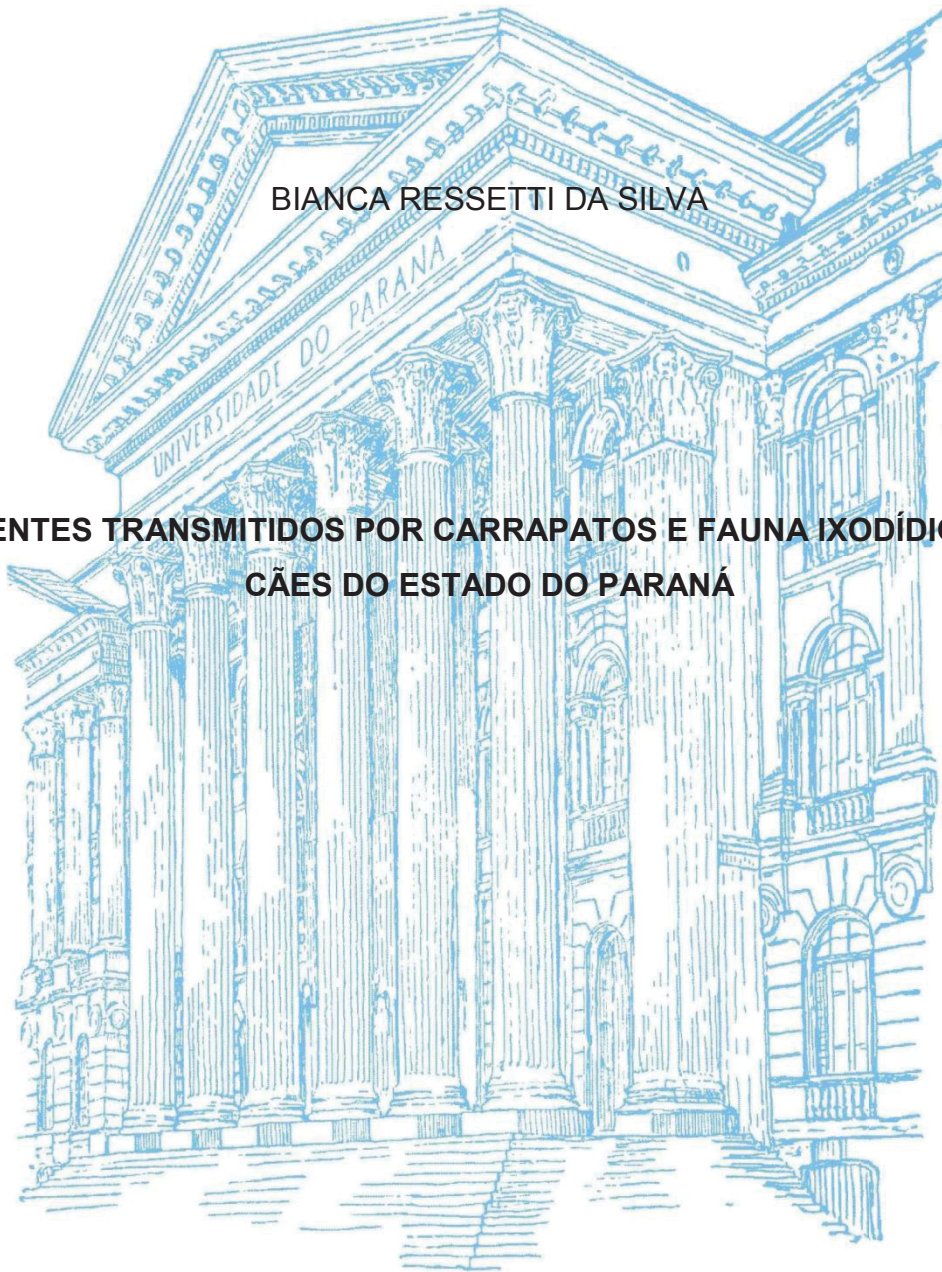


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

BIANCA RESSETTI DA SILVA

**AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS E FAUNA IXODÍDICA EM
CÃES DO ESTADO DO PARANÁ**



CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

BIANCA RESSETTI DA SILVA

**AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS E FAUNA IXODÍDICA EM
CÃES DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich

Comitê de Orientação: Professor Dr. Marlos Gonçalves Sousa e Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile

CURITIBA

2017

S586 Silva, Bianca Ressetti da
Agentes transmitidos por carrapatos e fauna ixodílica em cães
do Estado do Paraná / Bianca Ressetti da Silva – Curitiba 2017
104 f il

Orientadora Rosângela Locatelli Dittrich
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias – Patologia Veterinária

1 Carrapato 2 Cão – Doenças 3 Patologia veterinária
I Dittrich, Rosângela Locatelli II Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias – Patologia Veterinária III Título

CDU 595 42 619 6

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS E FAUNA IXODÍDICA EM CÃES DO PARANÁ**” apresentada pela Mestranda **BIANCA RESSETTI DA SILVA** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 16 de fevereiro de 2017



Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora



Professor Dr. Daniel Moura de Aguiar
Membro



Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile
Membro

Aos meus pais, Mário e Edilene,
pelo incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, Mario e Edilene, e aos meus irmãos Vinicius e Barbara, pelo apoio, confiança, paciência e amor incondicional.

Às minhas cachorras, Lana e Lara, pelo amor mais puro e verdadeiro!

A todos os professores pelos ensinamentos, em especial à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rosangela Locatelli Dittrich pela confiança, paciência, apoio e orientação. Agradeço pela oportunidade, pela idéia do projeto, por aceitar me orientar no doutorado e me inspirar na carreira acadêmica, como pesquisadora e docente.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR pela oportunidade e por estimular a pesquisa, através do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Renato Andreotti e à Empresa de Pesquisa Agropecuária Brasileira - Embrapa Gado de Corte, pela confiança e apoio nesse projeto. Também aos colegas dos Laboratórios de Biologia do Carrapato e Biologia Molecular do Carrapato, Vinicius, Marcos Valério, Isabella e Andrea, obrigada por me receberem em Campo Grande, pela paciência, ensinamentos e toda ajuda com os carrapatos.

Ao Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar e à Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT pela oportunidade e confiança. Às colegas do Laboratório de Virologia e Rickettsioses da UFMT, Isis e Amanda, obrigada por me receberem em Cuiabá, por toda ajuda com as minhas amostras, pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR Marília Koch, Flávia Moreira, Gabriela Maffezzolli, Daniele Von Kruger, Sandra Seixas, Morgana Kuteques, Reinaldo Regio, Aline Konell, Ana Paula Sato, Kamila Alcalá e Patrícia Montañó, obrigada por toda ajuda, pelas risadas, conversas e momentos de lazer. Ao bioquímico Olair Beltrame pela parceria e ajuda nos exames bioquímicos.

À amiga e mestranda Carolina Santos, obrigada pela convivência e parceria durante esses dois anos.

À minha vó de coração Etelvina Dambros (em lembrança) e às amigas Oriete e Amanda, por sempre me receberem muito bem em Curitiba e fazerem da casa de vocês a minha. Agradeço por todos os momentos compartilhados.

À minha amiga Denise, pela parceira se sempre, inclusive durante as coletas de amostras.

Aos colegas e médicos veterinários Lucas Quadros, Davi Scheifer, Talita Scheifer, Luana Warich, Jeisa Braga, Guilherme Aguiar, Juliana Santos, Carlos Coradassi, Pedro Teider e Karina Popovicz, por compartilharem seus pacientes comigo e pelo apoio na obtenção de amostras.

Ao Centro de Atenção Animal de Ponta Grossa e à Companhia de Operações com Cães - BOPE-K9 de Curitiba, por autorizarem a coleta de sangue e carrapatos dos cães, obrigada pela confiança.

A todos os cães que tiveram participação fundamental para a conclusão desse estudo, a vocês todo o meu respeito.

"Não importa se os animais são incapazes ou não de pensar. O que importa é que são capazes de sofrer."

(Jeremy Bentham)

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitas que podem transmitir diversos agentes patogênicos aos animais e seres humanos. A distribuição desses vetores varia de acordo com as características ambientais e a disponibilidade de hospedeiros de cada região. No Brasil, existem várias espécies parasitando cães. Dessa forma, o conhecimento das espécies de carrapatos que ocorrem em uma região é importante para determinar e precaver as possíveis doenças transmitidas por esses vetores e o risco de suas ocorrências. Nos cães com hemoparasitoses transmitidas por carrapatos, os sinais clínicos são semelhantes e inespecíficos. O diagnóstico baseado na identificação dos agentes infecto-parasitários é importante para avaliar o potencial zoonótico e o melhor tratamento. No Paraná existem poucos estudos que identificaram os carrapatos em cães e os agentes transmitidos por esses vetores. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo objetivou identificar as espécies de carrapatos que parasitam os cães nas mesorregiões geográficas: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP), e determinar a ocorrência de cada espécie por mesorregião. Foram coletadas amostras de carrapatos de 26 cães provenientes da mesorregião MC, 29 da COP e um da CSP. Os carrapatos foram retirados da pele dos cães com a utilização de pinça e acondicionados em tubos com álcool isopropílico. Dos 56 cães foram coletados 253 carrapatos que foram caracterizados morfológicamente de acordo com a espécie. Do total de carrapatos, 69,6% foram identificados como pertencentes à espécie *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s. l.), 28,1% como *Amblyomma aureolatum* e 2,4% como *A. ovale*. Dos 26 cães da mesorregião MC, 57,7% estavam parasitados por *R. sanguineus* s. l., 38,5% por *A. aureolatum* e 3,8% por *A. ovale*. Na mesorregião COP dos 29 cães parasitados, 72,4% eram por *A. aureolatum* e 27,6% por *R. sanguineus* s. l.. Na CSP foi obtida uma amostra, identificada como *A. aureolatum*. O segundo capítulo objetivou descrever as alterações clínicas e hematológicas observadas nos cães com carrapato; determinar a sorocorrência para piroplasmas nos cães das mesorregiões estudadas; investigar a presença de *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e outros agentes da família Anaplasmataceae nos cães; e descrever os resultados

hematológicos e bioquímicos dos cães infectados com *Rangelia vitalii*, *E. canis* e agentes da família Anaplasmataceae. Cinquenta e seis cães com carrapato foram avaliados por meio da história clínica, exames físicos e hematológicos, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizado o sequenciamento genético das amostras positivas na PCR para *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp. Amostras de sangue dos 56 cães foram obtidas por punção da veia cefálica ou jugular, acondicionadas em tubos estéreis: com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização do hemograma, exame de camada leucocitária e PCR; e em tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro para a sorologia. Os principais sinais clínicos observados nos cães com carrapato foram: depressão, anorexia, desidratação e febre. As principais alterações hematológicas nos cães com carrapato foram: anemia, leucocitose, neutrofilia e eosinofilia. A taxa de soropositividade no ELISA para piroplasmas foi de 76% na MC e 64,3% na COP. O cão da CSP foi soronegativo. Um cão procedente da mesorregião MC foi positivo na PCR para *Babesia* sp., contudo, o produto da PCR foi sequenciado e gerou sequências de DNA que foram 100% idênticas às amostras de *R. vitalii*; um cão da COP foi positivo na PCR para *Ehrlichia* sp., e no sequenciamento genético a amostra revelou 100% de identidade com *E. canis*; e um cão da MC foi positivo para a família Anaplasmataceae. As principais alterações nos exames do cão infectado por *R. vitalii* foram anemia, leucocitose, neutrofilia e trombocitopenia; hipoalbuminemia e aumento nos valores de uréia, AST, GGT, bilirrubina direta e total. No cão infectado por *E. canis* verificou-se anemia, leucocitose, neutrofilia e linfocitose; hipoalbuminemia e aumento da proteína total, bilirrubina direta, globulinas e ALT. No cão positivo para a família Anaplasmataceae verificou-se eosinofilia e hipoalbuminemia. Os resultados desse estudo indicam um risco potencial para a exposição dos cães para carrapatos das espécies *R. sanguineus* s. l., *A. aureolatum* e *A. ovale*, assim como para agentes transmitidos por eles, como a *R. vitalii*, *E. canis*, *B. canis* e agentes a família Anaplasmataceae, nas mesorregiões estudadas; possibilitaram a obtenção de dados de sorocorrência para piroplasmas, ainda não descrita no estado, consiste na detecção molecular e sequenciamento genético de *R. vitalii* e o primeiro sequenciamento genético de *E. canis* do Paraná.

Palavras-chave: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Ehrlichia canis*, piroplasma, *Rangelia vitalii*, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*.

ABSTRACT

Ticks are ectoparasites that can transmit various pathogenic agents to animals and humans. The distribution of these vectors varies according to the environmental characteristics and host availability of each region. In Brazil there are several species parasitizing dogs. Thus, knowledge of the tick species that occur in a region is important to determine and preclude the possible diseases transmitted by these vectors and the risk of occurrence. Dogs with tick-borne hemoparasitosis show non-specific and similar clinical signs. The diagnosis based on the identification of the infectious-parasitic agents is important to evaluate the zoonotic potential and the best treatment. In Paraná there are few studies that identified the ticks in dogs and the agents transmitted by these vectors. The present work was divided in two chapters. The first chapter aimed to identify the species of ticks that parasitize dogs in the geographic midland regions: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP), and determine the occurrence of each species by midland region. Samples of ticks were collected from 26 dogs from the MC midland region, 29 from the COP and one from the CSP. The ticks were removed from the dogs' skin using tweezers and packed in tubes with isopropyl alcohol. Of the 56 dogs were collected 253 ticks that were characterized morphologically according to the species. Of the total number of ticks, 69.6% were identified as belonging to the species *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s. l.)*, 28.1% as *Amblyomma aureolatum* and 2.4% as *A. ovale*. Of the 26 dogs of the MC midland region, 57.7% were parasitized by *R. sanguineus s. l.*, 38.5% by *A. aureolatum* and 3.8% by *A. ovale*. In the COP midland region of the 29 parasitized dogs, 72.4% were by *A. aureolatum* and 27.6% by *R. sanguineus s. l.*. In CSP, a sample, identified as *A. aureolatum*, was obtained. The second chapter aimed to describe the clinical and hematological changes observed in

dogs with ticks; to determine the serooccurrence for piroplasms in dogs of the midland regions studied; to investigate the presence of *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. and other agents of the Anaplasmataceae family in dogs; and to describe the hematological and biochemical results of dogs infected with *Rangelia vitalii*, *E. canis* and agents of the Anaplasmataceae family. Fifty-six dogs with ticks were evaluated through clinical history, physical and hematological exams, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). Was performed the gene sequencing of PCR positive samples for *Ehrlichia* sp. and *Babesia* sp. Blood samples from the 56 dogs were obtained by puncture of the cephalic or jugular vein, placed in sterile tubes: with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to perform the blood count, buffy coat and PCR; and in tubes without anticoagulant to obtain serum for serology. The main clinical signs observed in dogs with ticks were: depression, anorexia, dehydration and fever. The main hematological changes in dogs with ticks were: anemia, leukocytosis, neutrophilia and eosinophilia. The seropositivity rate in ELISA for piroplasms was 76% in MC and 64.3% in COP. The CSP dog was seronegative. A dog from the MC mesoregion was positive in the PCR for *Babesia* sp., nevertheless the PCR product was sequenced and generated DNA sequences that were 100% identical to the *R. vitalii* samples; one COP dog was positive in PCR for *Ehrlichia* sp., and in the gene sequencing of 100% identity sample with *E. canis*; and one MC dog was positive for the Anaplasmataceae family. The main alterations in the examinations of the dog infected by *R. vitalii* were anemia, leukocytosis, neutrophilia and thrombocytopenia; hypoalbuminemia and increased urea, AST, GGT, and total bilirubin levels. In the dog infected with *E. canis* the anemia, leukocytosis, neutrophilia, lymphocytosis, hypoalbuminemia and total protein increase, direct bilirubin, globulins and ALT, were observed. In the dog positive for the Anaplasmataceae family, eosinophilia and hypoalbuminemia were observed. The results of this study indicate a potential risk for the exposure of dogs to ticks of the species *R. sanguineus* s. l., *A. aureolatum* and *A. ovale*, as well as to agents transmitted by them, such as *R. vitalii*, *E. canis*, *B. canis* and agents of the Anaplasmataceae family, in the midland regions studied; made it possible to obtain serooccurrence data for piroplasms, not yet described in the state,

consists of the molecular detection and gene sequencing of *R. vitalii* and the first gene sequencing of *E. canis* from Paraná.

Keywords: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Ehrlichia canis*, piroplasm, *Rangelia vitalii*, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

FIGURA 1 - MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ.....32

FIGURA 2 - CARRAPATOS FÊMEA E MACHO DA ESPÉCIE *R. sanguineus* s.
l.34

FIGURA 3 - CARRAPATOS FÊMEA E MACHO DA ESPÉCIE *A. aureolatum*.34

FIGURA 4 - CARRAPATOS FÊMEA E MACHO DA ESPÉCIE *A. ovale*.....34

CAPITULO 2

FIGURA 1 - FOTOMICROGRAFIA DE ESFREGAÇÃO DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃO (CÃO 22) NATURALMENTE INFECTADO POR *R. vitalii* DEMONSTRANDO PRESENÇA DE PIROPLASMAS DE VIDA LIVRE E INTRA-ERITROCITÁRIO (SETA). MICROSCOPIA DE IMERSÃO (1000X). COLORAÇÃO DE ROMANOVSKY.....66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - OCORRÊNCIA DE CADA ESPÉCIE DE CARRAPATO POR MESORREGIÃO.....	36
---	----

CAPITULO 2

TABELA 1 - NÚMERO DE CÃES COM CARRAPATO E SOROPOSITIVOS PARA PIROPLASMAS, DE ACORDO COM O GÊNERO, IDADE E RAÇA, NO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL.....	60
---	----

TABELA 2 - SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES COM CARRAPATOS, RESULTADO SOROLÓGICO PARA PIROPLASMAS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR PARA <i>Babesia</i> sp., <i>Ehrlichia</i> sp. E FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE; E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO).....	61
---	----

TABELA 3 - ERITROGRAMA DOS CÃES ANÊMICOS SOROPOSITIVOS PARA PIROPLASMAS, ASSOCIADO AOS SINAIS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR PARA <i>Babesia</i> sp., <i>Ehrlichia</i> sp. E FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE; E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO).....	63
--	----

TABELA 4 - LEUCOGRAMA DOS CÃES COM LEUCOCITOSE SOROPOSITIVOS PARA PIROPLASMAS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR PARA <i>Babesia</i> sp., <i>Ehrlichia</i> sp. E FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE; E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO).....	64
---	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

CHGM - Concentração de Hemoglobina Globular Média

CK - creatina quinase

COP - Centro Oriental Paranaense

CSP - Centro Sul Paranaense

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FA - Fosfatase alcalina

GGT - gama-glutamil transferase

LDH - lactato desidrogenase

MC - Metropolitana de Curitiba

PCR - Polymerase Chain Reaction

PT - Proteínas totais

Rpm - rotações por minuto

Taq - *Thermus aquaticus*

UFPR - Universidade Federal do Paraná

VGM - Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 HIPÓTESES.....	22
1.2 OBJETIVOS.....	23
1.2.1 Objetivo geral.....	23
1.2.2 Objetivos específicos.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
2 CAPÍTULO 1. FAUNA IXODÍDICA EM CÃES DOMÉSTICOS DO PARANÁ, SUL DO BRASIL	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	27
2.1 INTRODUÇÃO.....	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.2.1 Comitê de Ética.....	31
2.2.2 Local do estudo.....	31
2.2.3 Animais	33
2.2.4 Coleta e preservação dos carrapatos.....	33
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
REFERENCIAS.....	40
3 CAPÍTULO 2. PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES DO PARANÁ- SUL DO BRASIL	45
RESUMO.....	45

ABSTRACT.....	46
3.1 INTRODUÇÃO.....	48
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1 Comitê de Ética.....	53
3.2.2 Local do estudo.....	53
3.2.3 Animais.....	54
3.2.4 Questionário.....	54
3.2.5 Coleta de sangue.....	54
3.2.6 Exames laboratoriais.....	55
3.2.7 Detecção de anticorpos contra piroplasmas.....	56
3.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56
3.2.9 Sequenciamento genético	58
3.3 RESULTADOS	58
3.3.1 Animais.....	58
3.3.2 PCR.....	59
3.3.3 Sequenciamento genético.....	59
3.3.4 Resultado sorológico para piroplasmas.....	60
3.3.5 Sinais clínicos.....	61
3.3.6 Resultados hematológicos.....	62
3.3.7 Resultados dos exames adicionais dos cães 22, 27 e 48.....	65
3.4 DISCUSSÃO.....	67

3.5 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
5. REFERÊNCIAS.....	83
6. ANEXOS.....	95
6.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA.....	95
6.2 METODOLOGIA DO ELISA PARA PIROPLASMAS	96
6.3 METODOLOGIA DA EXTRAÇÃO DE DNA	97
6.4 HEMOGRAMA E PPT DOS CÃES COM CARRAPATO.....	98
6.5 HEMOGRAMAS E URINÁLISE CÃO 22	100
6.6 HEMOGRAMA CÃO 27.....	102
6.7 HEMOGRAMA CÃO 48.....	103
6.8 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA SEQUÊNCIA GENÉTICA DA <i>Rangelia vitalii</i> NO GENBANK.....	104

1. INTRODUÇÃO GERAL

Carrapatos são ectoparasitos do filo *Arthropoda*, classe *Arachnida*, ordem *Acari* e subordem *Ixodida*. Existem aproximadamente 900 espécies de carrapatos conhecidas, que parasitam grande parte dos vertebrados e estão amplamente distribuídas geograficamente no planeta (ANDREOTTI e KOLLER, 2013).

Esses parasitas são vetores de doenças para animais domésticos, silvestres e o homem, pois possuem características biológicas que favorecem a transmissão de agentes patogênicos (ALMEIDA *et al.*, 2012a). Os carrapatos têm uma glândula salivar complexa, que interage com o hospedeiro promovendo o equilíbrio hídrico e interferindo no local da picada por meio de secreções de substâncias antihemostáticas, anti-inflamatórias, anestésicas e imunomoduladoras, promovendo um balanço na relação parasita-hospedeiro (ANDREOTTI e KOLLER, 2013).

O aparelho bucal do carrapato penetra na pele do hospedeiro, permanecendo fixado através do hipostômio e pela solidificação da secreção salivar. Ao provocar laceração dos tecidos e vasos sanguíneos, o carrapato ingere sangue e outros líquidos tissulares do hospedeiro e regurgita grandes volumes de saliva, que é a principal via de transmissão de patógenos (MASSARD e FONSECA, 2004). Além de ocasionar vários efeitos deletérios, desde a lesão cutânea ocasionada pela picada até anemia, inoculação de toxinas neurotrópicas e, eventualmente, causam a morte, variando de acordo com a espécie de carrapato e respectivo hospedeiro (ANDREOTTI e KOLLER, 2013).

Nos animais de companhia, os carrapatos são considerados os ectoparasitas mais importantes, sendo os transmissores de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, causando muitos óbitos (ALMEIDA *et al.*, 2012a). Essas hemoparasitoses são conhecidas popularmente como "doenças do carrapato", e o seu principal vetor e reservatório é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como carrapato marrom ou vermelho do cão (DANTAS-TORRES *et al.*, 2004).

A distribuição geográfica dos agentes patogênicos transmitidos por carrapatos acompanha a distribuição dos vetores (OYAFUSO *et al.*, 2002). Por exemplo, o protozoário *Rangelia vitalii* ocorre no sul e sudeste do Brasil (SOARES *et al.*, 2011; LEMOS *et al.*, 2012), onde carrapatos da espécie *Amblyomma aureolatum*, reconhecida como vetor, são comumente encontrados em cães que freqüentam o ambiente da Mata Atlântica (SZABÓ *et al.*, 2013). Este protozoário afeta principalmente cães jovens e, geralmente, cães usados para caça, situação que aumenta a chance de contato direto com esses carrapatos (FRANÇA *et al.*, 2010).

O protozoário *Babesia gibsoni* foi relatado exclusivamente no sul do Brasil (JOJIMA *et al.*, 2008), o que sugere que o *R. sanguineus* não é o seu vetor no país, considerando que esse carrapato é predominante em praticamente todas as regiões do Brasil e os agentes patogênicos transmitidos por ele, como *B. vogeli* e *E. canis*, são difundidos no país, e não concentrados em uma região específica como ocorre com *B. gibsoni* (DANTAS-TORRES e OTRANTO, 2014).

Dessa forma, é importante o conhecimento dos carrapatos e dos patógenos que podem ser transmitidos e que participam diretamente na manutenção enzoótica de doenças *in loco*, para que o diagnóstico dessas doenças seja rápido e preciso, e também para a elaboração de estratégias de controle (ALMEIDA e ANDREOTTI, 2013).

Os diferentes ecossistemas existentes no Brasil propiciam a ocorrência de grande diversidade de espécies de carrapatos parasitando cães no país. As características ambientais e a diversidade de espécies de hospedeiros de cada região são os pontos fundamentais para a existência de determinadas espécies de carrapatos nos cães (LABRUNA *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstraram que carrapatos do gênero *Amblyomma* são comumente encontrados em áreas rurais e de mata, os da espécie *R. sanguineus*, são mais comuns infestando cães domésticos em áreas urbanas (LABRUNA e PEREIRA, 2001; SZABÓ *et al.*, 2013).

No Brasil, há relatos de infecções em cães causadas por *B. canis*, *R. vitalii* e *E. canis*, que são parasitas intracitoplasmáticos de eritrócitos e / ou leucócitos no sangue de animais (TRAPP *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2010). As alterações clínicas e hematológicas são frequentemente inespecíficas e podem variar de acordo com a espécie infectante, o estágio da infecção e infecção concomitante com outros agentes patogênicos transmitidos por carrapatos (SUKASAWAT *et al.*, 2000).

Em cães, as manifestações clínicas da rangeliose, assim como da erliquiose e babesiose, por exemplo, dependem da evolução da doença, aguda, subclínica ou crônica (SILVA *et al.*, 2013). Os animais infectados podem apresentar condições clínicas e patológicas diferentes, caracterizadas principalmente por anemia, alterações de coagulação, alterações no leucograma, edema, hipoplasia da medula óssea, aumento do fígado, baço e linfonodos e hemorragias (LORETTI e BARROS, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES e FIGUEIREDO, 2006; BORIN *et al.*, 2009; FIGHERA *et al.*, 2010, FRANÇA *et al.*, 2010). Contudo, estes parasitas causam várias alterações patológicas e sinais clínicos semelhantes, o que muitas vezes complica o diagnóstico (SILVA *et al.*, 2013).

A pesquisa de inclusões intracitoplasmáticas características, em esfregaço de sangue periférico, é uma opção para o diagnóstico definitivo nos casos onde há suspeita de infecção por *E. canis*, *Babesia spp.* e *R. vitalii*, porém a sensibilidade do método é baixa (CESAR, 2008; JOJIMA, *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). Além disso, esse método depende da qualidade da coleta de amostra e da experiência do patologista clínico, levando algumas vezes a erros subjetivos (KIRTZ e LEIDINGER, 2015).

Os testes sorológicos são úteis para identificar pacientes assintomáticos e diagnosticar infecções crônicas quando o nível de parasitemia está baixo ou não detectável no esfregaço de sangue periférico (JOJIMA *et al.*, 2008). Entretanto, a sorologia é incapaz de distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia ao agente, e podem ocorrer reações cruzadas (SUKASAWAT *et al.*, 2000; CESAR, 2008). Em áreas não endêmicas, como no

estado do Paraná, pode tornar-se um excelente método complementar de diagnóstico.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um teste molecular promissor para o diagnóstico de muitas doenças parasitárias, pois sua sensibilidade permite a amplificação de fragmentos de genes a partir de quantidades diminutas de ácidos nucleicos a partir de pequenas quantidades de material genético do parasita (GASSER, 2006). Dessa forma, esta técnica é frequentemente apropriada para detecção de bactérias que necessitam de métodos complexos para serem isoladas em cultivo, como espécies de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. Resultados de PCR positivos são uma excelente ferramenta diagnóstica para casos de pacientes com sinais clínicos (DANIELS, 2013).

Atualmente, o diagnóstico molecular de agentes transmitidos por carrapatos tem sido realizado principalmente em pesquisas e na rotina clínica dos hospitais veterinários das universidades ou de grandes cidades. As desvantagens da PCR são a exigência de equipamentos de laboratório especializado e equipe bem treinada (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006).

A dificuldade do diagnóstico clínico dessas enfermidades e a ausência de sinais clínicos patognomônicos dessas infecções resultam em subnotificação, dificultando a elaboração de medidas de controle e profilaxia (ALMEIDA e ANDREOTTI, 2013).

Os sinais clínicos inespecíficos e semelhantes que os cães apresentam, dificultam o diagnóstico das diferentes doenças que podem ser transmitidas por carrapatos, que podem ter caráter zoonótico e muitas vezes levar ao óbito. Na rotina clínica veterinária não é comum a identificação das espécies de carrapatos encontradas nos cães. No Paraná existem poucos estudos de identificação de carrapatos em cães e os agentes transmitidos por esses vetores, sendo que a maioria foi realizada na região norte do estado, apesar da ocorrência nas outras mesorregiões (GUIMARÃES, 1945; LABRUNA *et al.*, 2001; OYAFUSO *et al.*, 2002; ARZUA *et al.*, 2005; TRAPP *et al.*, 2006;

JOJIMA *et al.*, 2008; FORTES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2013).

O presente trabalho foi desenvolvido e dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda a identificação das espécies de carrapatos que parasitam os cães nas mesorregiões geográficas: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP), com o título: "Fauna ixodídica em cães domésticos do Paraná, Sul do Brasil". O segundo capítulo compreende a descrição das alterações clínicas e hematológicas dos cães com carrapato, a sorocorrência para piroplasmas nas mesorregiões estudadas, a investigação da presença de *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e outros agentes da família Anaplasmataceae nos cães; e a descrição dos resultados hematológicos e bioquímicos dos cães infectados com *Rangelia vitalii*, *E. canis* e agentes da família Anaplasmataceae, cujo título é: "Patógenos transmitidos por carrapatos em cães do Paraná - Sul do Brasil".

1.1 HIPÓTESES

A espécie de carrapato mais prevalente em cães no Paraná é a *Rhipicephalus sanguineus*.

Os cães com carrapato são soropositivos para piroplasmas.

Há uma alta incidência de hemoparasitas nos cães com carrapatos.

O principal agente patogênico transmitido por carrapatos aos cães no estado do Paraná é a *Ehrlichia canis*.

Os agentes patogênicos dos gêneros *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp. são transmitidos por carrapatos aos cães no Paraná.

Os cães com doenças transmitidas por carrapatos apresentam sinais clínicos graves e anemia.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Este estudo objetivou determinar a ocorrência das espécies de carrapatos em cães nas mesorregiões geográficas: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP), e identificar infecções causadas por agentes transmitidos por esses vetores aos cães.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1- Identificar as espécies de carrapatos encontradas em cães de áreas urbanas e rurais das mesorregiões MC, COP e CSP;
- 2- Determinar a ocorrência de cada espécie de carrapato por mesorregião;
- 3- Descrever as alterações clínicas e hematológicas dos cães com carrapato;
- 4- Determinar a prevalência sorológica de piroplasmas nas mesorregiões;
- 5- Detectar a presença do DNA de *Babesia* sp., *E. canis* e agentes da família Anaplasmataceae nos cães;
- 6- Descrever os resultados hematológicos e bioquímicos dos cães infectados com *Rangelia vitalii*, *E. canis* e agentes da família Anaplasmataceae.

REFERENCIAS

ALMEIDA, R. F. C.; ANDREOTTI, R. Principais doenças transmitidas por carrapatos no Brasil. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. Embrapa, Brasília, DF, p.33-49, 2013.

ALMEIDA, R. F. C.; MATIAS, J.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R. (2012a). **Importância dos carrapatos na transmissão da Febre Maculosa Brasileira**. Embrapa, Brasília, DF, 2012.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. 1. ed, Embrapa, Brasília, DF, 2013.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, **Brazil Rev Bras Zool**, v. 22, n. 3, p. 623-632, 2005.

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

CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 57 p. Dissertação de Mestrado.

DANIELS, J. B. Molecular diagnostics for infectious disease in small animal medicine: an overview from the laboratory. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.43, n. 6, p. 1373-1384, 2013.

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

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, p. 1151-154, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 22, n. 7, p. 1-25, 2014.

FIGHERA, R. A; SOUZA, T. M; KOMMERS, G. G.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalli* em 35 cães (1985-2009). **Pesqui Vet Bras**, v. 30, p. 974-987, 2010.

FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R. V.; BONACIM, J. E.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 4, p. 222-227, 2010.

FRANÇA, R. T.; SILVA, A. S.; PAIM, F. C.; COSTA, M. M.; SOARES, J. F.; MAZZANTI, C. M.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalli* in dogs in Southern Brazil. **Comp Clin Path**, v. 19, p. 383-387, 2010.

GASSER, R. B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Vet Parasitol**, v. 136, p. 69-89, 2006.

GUIMARÃES, L. R. Sobre alguns ectoparasitos de aves e mamíferos do litoral paranaense. **Arq Mus Paran**, Curitiba, p. 179-90, 1945.

JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C.; BALARIN, M. R. S.; FABRETTI, A. K.; GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KIRTZ, G.; LEIDINGER, E. In-clinic diagnosis of canine anaplasmosis based on haematological abnormalities and evaluation of a stained blood smear. **Tierärztl Praxis Kleintiere**, v. 43, n. 2, p. 101-106, 2015.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clin Vet**, v. 30, p. 24-32, 2001.

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

LEMONS, T. D.; CERQUEIRA, A. M.; TOMA, H. K.; SILVA, A. V.; CORREA, R. G.; PALUDO, G. R.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, p. 137-142, 2012.

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

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **Hora Vet**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MENDONÇA, C. S.; MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S.; MORO, T. V. Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosci J**, v. 21, p. 167-174, 2005.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no Norte do Paraná. **Semin: Ciêns Agrár**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

SILVA, A. S.; MARTINS, D. B.; SOARES, J. F.; FRANÇA, R. T. Canine rangeliosis: the need for differential diagnosis. **Parasitol Res**, v. 112, p.1329–1332, 2013.

SILVA, G. C. F.; BENITEZ, A. N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A.; MUNDIM, M. J. S.; GUIMARÃES, E. C. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Biosci J**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 892-900, 2014.

SOARES, J. F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P. E.; SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; LABRUNA, M. B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 180, p. 203-208, 2011.

SUKASAWAT, J.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med**, v.14, p.50-55, 2000.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rain forest Rickettsia, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 30, p. 1-10, 2013.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet Parasitol**, v. 140, p. 223-230, 2006.

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; NASCIMENTO, D. A. G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013.

2. CAPITULO 1. FAUNA IXODÍDICA EM CÃES DOMÉSTICOS DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

RESUMO

Os carrapatos são vetores de vários agentes patogênicos para animais e seres humanos. A identificação das espécies de carrapatos que circulam nas diferentes regiões é importante para ampliar o conhecimento de dispersão desses vetores, dos estudos epidemiológicos, de ecobiologia e controle. O presente estudo objetivou contribuir com a identificação e o registro das espécies de carrapatos que parasitam cães de áreas rurais e urbanas de três mesorregiões do Paraná, sul do Brasil, e estimar a taxa de ocorrência de cada espécie. Cinquenta e seis cães com carrapatos, provenientes das mesorregiões: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP) foram utilizados no estudo. Dos 56 cães foram coletados 253 carrapatos que foram identificados e caracterizados morfológicamente de acordo com a espécie. Do total de carrapatos, 69,6% foram identificadas como pertencentes à espécie *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s. l.); 28,1% como *Amblyomma aureolatum* e 2,4% como *Amblyomma ovale*. Dentre os animais avaliados, provenientes da MC, 57,7% estavam parasitados por *R. sanguineus s. l.*, 38,5% por *A. aureolatum* e 3,8% por *A. ovale*; enquanto na COP 72,4% dos cães foram parasitados por *A. aureolatum* e 27,6% por *R. sanguineus s. l.*. Na CSP foi obtido um carrapato, identificado como *A. aureolatum*.

Palavras chave: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, ectoparasitos, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, vetor.

IXODIDAE FAUNA OF DOMESTIC DOGS IN PARANA, SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Ticks are vectors of various agents that are pathogenic towards animals and humans. Identification of the tick species circulating in different regions is important for expansion of knowledge regarding vector dispersion, epidemiology, ecobiology and control. The present study aimed to contribute towards identification and registration of tick species that parasitize dogs in rural and urban areas of three mesoregions of Paraná, southern Brazil, and to estimate the rate of occurrence of each species. Fifty-six dogs with ticks living in three mesoregions: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) and Centro Sul Paranaense (CSP), were used in the study. From these 56 dogs, 253 ticks were collected and were identified and morphologically characterized according to the species. Among all the ticks, 69.6% were identified as belonging to the species *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (*s. l.*); 28.1% as *Amblyomma aureolatum* and 2.4% as *Amblyomma ovale*. Among the dogs in MC that were evaluated, 57.7% were parasitized by *R. sanguineus s. l.*, 38.5% by *A. aureolatum* and 3.8% by *A. ovale*; while in COP, 72.4% of the dogs were parasitized by *A. aureolatum* and 27.6% by *R. sanguineus s. l.*. In CSP, one tick was obtained, which was identified as *A. aureolatum*.

Keywords: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, ectoparasites, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, vector.

2.1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos do filo *Arthropoda*, classe *Arachnida*, ordem *Acari* e subordem *Ixodida* (ANDREOTTI e KOLLER, 2013). Atualmente são conhecidas 896 espécies de carrapatos no mundo, divididas em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttallielidae (GUGLIELMONE *et al.*, 2010). No Brasil, 70 espécies foram descritas até o presente momento (BARROS BATTESTI *et al.*, 2015; KRAWCZAK *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2014, 2016; LABRUNA *et al.*, 2016; OGRZEWALSKA e PINTER, 2016; WOLF *et al.*, 2016).

As características ambientais e a diversidade de espécies de hospedeiros de cada região são os pontos fundamentais para a existência de determinadas espécies de carrapatos nos cães. Dessa forma, os diferentes ecossistemas existentes no Brasil resultam em uma grande diversidade de espécies de carrapatos que podem parasitar cães no país (LABRUNA *et al.*, 2001). Cães criados em ambientes urbanos, dentro ou fora das residências, na sua grande maioria, são parasitados por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus s. l.* (LABRUNA e PEREIRA, 2001). Em cães de áreas rurais ou suburbanas, onde vivem soltos e têm acesso livre às matas e outros ambientes, esses animais estão expostos a infestação por várias espécies de carrapatos originalmente nativos de mamíferos silvestres da fauna brasileira, pertencentes ao gênero *Amblyomma* spp. e também por *Rhipicephalus microplus* (LABRUNA e PEREIRA, 2001; LABRUNA *et al.*, 2001).

Os carrapatos *R. sanguineus s. l.* são de origem africana e se disseminaram por todo o mundo junto com humanos e seus cães (GUGLIELMONE *et al.*, 2003). Esses carrapatos são vetores bem reconhecidos de muitos patógenos que afetam cães e podem ser encontrados em áreas urbanas e rurais, sendo altamente adaptados para viver dentro de habitações humanas e estarem ativos durante todo o ano não só em regiões tropicais e subtropicais, mas também em algumas áreas temperadas (DANTAS-TORRES, 2010).

Até o final do século XX, o táxon *Rhipicephalus sanguineus* foi utilizado para representar uma única espécie de carrapato com uma distribuição quase cosmopolita, principalmente associada com cães domésticos (WALKER *et al.*, 2000). Porém, nos últimos 10 anos, vários estudos baseados em análises moleculares (SZABÓ *et al.*, 2005; BURLINI *et al.*, 2010; MORAES-FILHO *et al.*, 2011; NAVA *et al.*, 2012), biológicas (SZABÓ *et al.*, 2005) e morfológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2015) revelaram que pelo menos duas espécies distintas foram consideradas sob o táxon *R. sanguineus* na América Latina. Moraes-Filho *et al.* (2011) nomearam estas duas espécies como "temperado" e "tropical", o primeiro restrito ao cone sul da América do Sul (Uruguai, Argentina, Chile e do extremo sul do Brasil), e o segundo abrangendo o resto da América Latina, do México ao Brasil.

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* que parasitam os cães são nativos do território brasileiro e vivem nas matas parasitando várias espécies de mamíferos e aves autóctones, os cães que invadem estes ecossistemas se tornam hospedeiros acidentais. Esses carrapatos são conhecidos por apresentar hábitos de tocaia porque vivem no interior das matas e, quando prontos para mais uma alimentação, ficam sobre um ramo de mato ou arbusto, esperando que um hospedeiro apropriado passe por ali (LABRUNA e PEREIRA, 2001).

No Paraná, os estudos de identificação das espécies de carrapatos em cães são restritos à região norte do estado, onde carrapatos das espécies *R. sanguineus s. l.* (LABRUNA *et al.*, 2001; OYAFUSO *et al.*, 2002), *R. microplus*, *A. aureolatum*, *A. ovale* (LABRUNA *et al.*, 2001) e *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) parasitando cães (OYAFUSO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2013) foram descritos.

Os carrapatos são vetores de doenças entre animais domésticos e silvestres, bem como para o homem, pois apresentam várias características biológicas que favorecem a transmissão de agentes patogênicos (HARWOOD e JAMES, 1979). Esses ectoparasitas formam o segundo grupo em importância como vetores de doenças infecciosas (SILVA e GALVÃO, 2004). Em cães, as mais comuns transmitidas por carrapatos, são a babesiose e a erliquiose canina (DANTAS-TORRES *et al.*, 2004). Uma zoonose severa veiculada por carrapatos é a febre maculosa brasileira, causada pela *Rickettsia rickettsii*, podendo os cães ser hospedeiros sentinelas para essa bactéria (FORTES, 2010). Estudos moleculares verificaram a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos das espécies *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. longirostre* e *R. sanguineus s. l.* (PINTER e LABRUNA, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; SZABÓ *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o conhecimento da fauna ixodídica de uma região é importante para prever as possíveis doenças transmitidas por esses vetores e o risco de ocorrência (OYAFUSO *et al.*, 2002). O objetivo do presente estudo foi identificar as espécies de carrapatos que parasitam cães de áreas urbanas e rurais das mesorregiões Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental

(COP) e Centro Sul Paranaense (CSP), e determinar a ocorrência de cada espécie por mesorregião.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Paraná- UFPR (035/2015).

2.2.2 Local do estudo

O estudo foi realizado em cães procedentes das mesorregiões geográficas: MC (Antonina, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Curitiba, Matinhos, Paranaguá, São José dos Pinhais), COP (Carambeí, Castro, Ponta Grossa) e CSP (Guarapuava). Os carrapatos foram coletados nos cães nas residências dos proprietários, no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná e em clínicas veterinárias. A FIGURA 1 evidencia a localização das dez mesorregiões paranaenses.

A mesorregião MC esta localizada em uma área que engloba a planície litorânea e o Primeiro Planalto Paranaense. Das cidades estudadas, Antonina, Matinhos e Paranaguá pertencem ao litoral. Nessa área as formas de relevo predominantes são as planícies de restinga e flúvio-marinhas, terraços arenosos, dunas e praias. As cidades de Campina Grande do Sul, Campo Largo, Curitiba e São José dos Pinhais, estão localizadas no Primeiro Planalto, tem como formas predominantes de relevo topos alongados e aplainados, vertentes convexas e vales em “V”. Carambeí, Castro e Ponta Grossa (COP) localizam-se no Segundo Planalto Paranaense, com relevo predominantemente composto por topos alongados, vertentes retilíneas e côncavas e vales em “U”. A cidade de Guarapuava (CSP) esta situada no Terceiro Planalto Paranaense e tem como formas predominantes de relevo topos aplainados, vertentes

retilíneas e convexas e vales em “U”, modeladas em rochas (MINEROPAR, 2006).

FIGURA 1. MAPA DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: Costa e Rocha, 2014.

Segundo a classificação de Köppen, as três mesorregiões estudadas apresentam predominantemente o clima temperado (cfb), com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C, com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e sem estação seca definida. Contudo, as cidades de Antonina, Matinhos e Paranaguá (MC) localizadas no litoral, apresentam clima subtropical (cfa), caracterizando-se por temperaturas médias, nos meses mais frios inferiores a 18°C e no mês mais quente, acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo não há uma estação seca definida (IAPAR, 1994).

2.2.3 Animais

O delineamento amostral foi de conveniência, conforme a rotina do Hospital Veterinário da UFPR e das clínicas veterinárias colaboradoras. Foram avaliados 56 cães, tendo como critério de inclusão no estudo a presença de carrapato no animal.

Nas mesorregiões MC e COP as coletas foram realizadas no período de junho de 2015 a março de 2016, na CSP a coleta foi realizada em agosto de 2015.

2.2.4 Coleta e preservação dos carrapatos

Os cães foram inspecionados e os carrapatos encontrados foram retirados por meio de torções leves, seguidas de movimentos de tração, com a utilização de pinça e em seguida, acondicionados em tubos com álcool isopropílico e identificados. Todos os carrapatos coletados de um mesmo animal foram armazenados num mesmo frasco. Foram obtidas informações quanto à forma de criação dos cães (área urbana ou rural, com ou sem acesso a áreas de matas e pastagens).

Os carrapatos foram classificados de acordo com chaves dicotômicas (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006; ONOFRIO, 2007; MARTINS *et al.*, 2010), com auxílio de estereomicroscópio, no Laboratório de Biologia do Carrapato (Embrapa Gado de Corte).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram coletados 253 carrapatos dos cães, sendo 178 (70,3%) obtidos na mesorregião MC, 74 (29,2%) na COP e um (0,4%) na CSP. Na identificação foram obtidos os seguintes resultados: 176 da espécie *R. sanguineus s. l.* (FIGURA 2), sendo 173 adultos (120 fêmeas e 53 machos) e três ninfas; 71 da espécie *A. aureolatum* (FIGURA 3), com 67 em estágio adulto (49 fêmeas e 18 machos) e quatro ninfas; e seis exemplares adultos de *A. ovale* (FIGURA 4) (três machos e três fêmeas).

FIGURA 2. CARRAPATOS FÊMEA E MACHO DA ESPÉCIE *R. sanguineus s. l.*

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 3. CARRAPATOS FÊMEA E MACHO DA ESPÉCIE *A. aureolatum*

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 4. CARRAPATOS FÊMEA E MACHO DA ESPÉCIE *A. ovale*

FONTE: O autor (2017).

Do total de carrapatos coletados, 69,6% foram identificados como pertencentes à espécie *R. sanguineus s. l.*, 28,1% como *A. aureolatum* e 2,4% como *A. ovale*. Os carrapatos *R. sanguineus s. l.* apresentam palpos e hipostômio curtos, com a base dorsal do capítulo na forma hexagonal, os machos possuindo placas adanais; escudo sem ornamentações e a coloração variando de castanha avermelhada a castanha (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006). A espécie *A. aureolatum* tem como características essenciais para identificação a presença, na coxa I, de espinhos longos, subiguais e contíguos, o externo terminando em ponta reta; o escudo é castanho-claro predominando o colorido amarelo-dourado. Para *A. ovale*, a descrição é semelhante, contudo nessa espécie o espinho externo é ligeiramente encurvado para fora e pouco mais longo que o interno; e o escudo se caracteriza por ser castanho com manchas acobreadas a esverdeadas (ONOFRIO, 2007).

As ocorrências de cada espécie, de acordo com as mesorregiões, estão demonstradas na TABELA 1. O presente estudo demonstrou que dos 26 cães da mesorregião MC, 15 (57,7%) estavam parasitados por *R. sanguineus s. l.*, 10 (38,5%) por *A. aureolatum* e 1 (3,8%) por *A. ovale*. No catálogo da coleção de carrapatos do Museu de História Natural Capão da Imbuia (localizado em Curitiba, Paraná) (ARZUA *et al.*, 2005), espécimes obtidos de animais durante trabalhos de campo e doações de pesquisadores estão citados, indicando espécie, localização e hospedeiro; havendo registros de carrapatos *R. sanguineus s. l.* parasitando cães nos municípios de Curitiba, Pontal do Paraná, Londrina e Maringá; *A. aureolatum* em cães na mesorregião MC; e *A. ovale* em cães dos municípios de Guaraqueçaba e Morretes. Dessa forma, esse é o primeiro trabalho que obteve amostras de carrapatos de cães de três mesorregiões do estado do Paraná e determinou a ocorrência de cada espécie por mesorregião; e consiste no primeiro registro da ocorrência de *A. ovale* parasitando cão na cidade de Antonina.

Nesse estudo, foram identificados carrapatos de cães das mesorregiões COP e CSP pela primeira vez, onde dos 29 cães parasitados, 21 (72,4%) eram por *A. aureolatum* e 8 (27,6%) por *R. sanguineus s. l.* na mesorregião COP e a amostra do cão da mesorregião CSP foi identificada como *A. aureolatum*. Estudos prévios realizados na região norte do Paraná verificaram carrapatos

das espécies: *R. sanguineus* (LABRUNA *et al.*, 2001; OYAFUSO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2013), *R. microplus*, *A. aureolatum* (LABRUNA *et al.*, 2001), *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) (OYAFUSO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2013) e *A. ovale* (LABRUNA *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2013) parasitando cães. A diferença de ocorrência encontrada em outros estudos pode ter sido devido à população estudada, às características ambientais (variação climática) e os possíveis hospedeiros presentes nas mesorregiões.

TABELA 1. OCORRÊNCIA DE CADA ESPÉCIE DE CARRAPATO POR MESORREGIÃO.

Mesorregião	<i>R. sanguineus s.l.</i>	<i>A. aureolatum</i>	<i>A. ovale</i>
MC	57,7% (15/26)	38,5% (10/26)	3,8% (1/26)
COP	27,6% (8/29)	72,4% (21/29)	0% (0/29)
CSP	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
Total de cães parasitados	41,1% (23/56)	57,1% (32/56)	1,8% (1/56)

MC: Mesorregião Metropolitana de Curitiba, COP: Centro Oriental Paranaense, CSP: Centro Sul Paranaense.

No presente trabalho, nenhum cão apresentou infestação por mais de uma espécie de carrapato. Labruna *et al.* (2001), observaram co-infestações por carrapatos *R. microplus*, *A. aureolatum* e *A. ovale* em 15,8% dos cães parasitados na região norte do Paraná.

Constatou-se que os 23 (41,1%) cães parasitados por *R. sanguineus s. l.* eram criados em ambiente urbano. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que os carrapatos dessa espécie são endofílicos (adaptados para viver em ambientes internos) e monotrópicos (todos os estádios de desenvolvimento se alimentam da mesma espécie hospedeira) (DANTAS-TORRES, 2010). Nas áreas urbanas, a disponibilidade de habitats para as fases de vida livre do *R. sanguineus* é abundante, uma vez que esse carrapato tem por hábito penetrar em pequenos buracos ou frestas em superfícies de cimento ou madeira (DIPEOLU *et al.*, 1982). Na cidade de Porto Alegre (Rio Grande do Sul) verificou-se que, dos cães parasitados por carrapatos, 93,2% eram por *R. sanguineus*, 2,97% por *A. aureolatum* e 3,81% pelas duas espécies (RIBEIRO

et al., 1997). Em cães da cidade de Juiz de Fora (Minas Gerais), a espécie de carrapato mais prevalente foi *R. sanguineus*, em 60,6% dos cães, seguida por espécies do gênero *Amblyomma* sp. (13,5%) (RODRIGUES *et al.*, 2001). Na região norte do Paraná, uma distribuição similar de carrapatos foi encontrada em cães de uma população hospitalar, também procedente de zona urbana (OYAFUSO *et al.*, 2002).

Almeida *et al.* (2013) avaliando a presença de carrapatos em cães de área urbana e periurbana da cidade de Campo Grande (Mato Grosso do Sul) constataram uma presença maciça de carrapatos da espécie *R. sanguineus* nos 148 cães avaliados. Foi observada prevalência de 98,9% de *R. sanguineus* do total de carrapatos coletados, enquanto que o carrapato *A. sculptum* foi encontrado em apenas 1,1% dos cães avaliados. Neste estudo, carrapatos da espécie *R. sanguineus* s. l. não foram encontrados nos cães de áreas rurais, diferentemente dos resultados obtidos por Labruna *et al.* (2001), que verificaram maior prevalência de carrapatos dessa espécie em cães da área rural da região norte do estado. Outro estudo, realizado com cães da região norte do Paraná, identificou 67,1% de *R. sanguineus* em cães da área rural (VIEIRA *et al.*, 2013). Embora *R. sanguineus* seja um carrapato adaptado às condições das áreas urbanas, algumas formas de criação de cães em áreas rurais possibilitam o seu estabelecimento nessas áreas (LABRUNA *et al.*, 2001). Apesar de serem altamente endofílicos, os carrapatos dessa espécie podem sobreviver em ambientes externos, principalmente se refúgios estiverem disponíveis (DANTAS-TORRES, 2010).

Dos 32 cães parasitados por *A. aureolatum*, 19 (59,4%) eram procedentes de áreas rurais e 13 (40,6%) de áreas urbanas, porém todos tinham acesso a áreas de mata. Esse resultado pode ser explicado por essa espécie de carrapato ser encontrada com regularidade em animais silvestres, principalmente canídeos e felídeos; e por ser uma das espécies que melhor se adaptou ao cão no Sul do Brasil (ARAGÃO e FONSECA, 1961). No Paraná, a espécie *A. aureolatum* foi registrada pela primeira vez infestando um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) em Caiobá, no município de Matinhos (MC) (GUIMARÃES, 1945). Existem registros dessa espécie parasitando cães da

MC (ARZUA *et al.*, 2005) e da área rural do norte do estado (LABRUNA *et al.*, 2001).

É interessante observar que os carrapatos da espécie *A. ovale* foram obtidos em apenas um cão, procedente da área rural, com acesso a áreas de mata, do município de Antonina (MC), localizado no litoral. Barros & Baggio (1992), também observaram o parasitismo por essa espécie de carrapato em um furão-pequeno (*Galictis cuja*), no município de Paranaguá, localizado na mesma mesorregião. De acordo com Flechtmann (1990), *A. ovale* é uma espécie comum dos animais selvagens no Brasil (onças, cervídeos, quatis, raposas, etc.) e, com o tempo, adaptou-se aos cães domésticos nas zonas rurais, sendo hoje um dos carrapatos comuns de serem encontrados nesses animais. Segundo Szabó *et al.* (2013) em estudo realizado em região de mata Atlântica a espécie de carrapato mais encontrada em cães foi *A. ovale*. Vieira *et al.* (2013), verificaram que 31,3% dos carrapatos dos cães da área rural da região norte do Paraná eram da espécie *A. ovale*.

No presente trabalho, o encontro de *A. aureolatum* e *A. ovale* em cães de área rural ou urbana com acesso a áreas de mata e pastagens, demonstra que esses cães podem entrar em contato com diferentes patógenos veiculados por esses carrapatos, possibilitando assim uma maior proximidade dos agentes patogênicos com seres humanos, uma vez que os carrapatos e os patógenos podem ser trazidos para o convívio das pessoas mediante os cães (LABRUNA *et al.*, 2000; SZABÓ *et al.*, 2013), valendo ressaltar que *A. aureolatum* é um importante vetor de *Rickettsia rickettsii* para seres humanos no Brasil (PINTER e LABRUNA, 2006), principalmente na região do estudo. E carrapatos *A. ovale* são potenciais vetores de *Hepatozoon canis* nas áreas rurais do Brasil (RUBINI *et al.*, 2009). Os principais carrapatos do gênero *Amblyomma* sp. que parasitam cães no Brasil, *A. sculptum*, *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. aureolatum*, *A. oblongoguttatum* e *A. tigrinum*, não possuem grande especificidade de hospedeiro, sendo os cães, assim como os seres humanos, hospedeiros acidentais quando adentram no meio rural (LABRUNA e PEREIRA, 2001).

Com relação ao grau de infestação, a média de carrapatos por cão foi de 6,8 na mesorregião MC e de 2,5 na COP. Na mesorregião CSP foi obtido um

carrapato de um cão. Contudo, 82,1% dos cães tinham de 1 a 5 carrapatos. Os cães da zona rural da região norte do Paraná apresentaram uma infestação média de 2,5 carrapatos por cão (LABRUNA *et al.*, 2001). Em cães de rua de Porto Alegre (Rio Grande do Sul) a média de infestação foi superior, com 22,4 carrapatos (*R. sanguineus*) por cão, porém 58,8% dos animais tinham de 1 a 5 carrapatos (RIBEIRO *et al.*, 1997). O carrapato *R. sanguineus s. l.* é o mais prevalente em cães de áreas urbanas e as infestações geralmente ocorrem de forma mais intensa (SZABÓ *et al.*, 2001; SZABÓ *et al.*, 2010).

Verificou-se que os cães procedentes da cidade de Paranaguá (MC), apresentaram maior grau de infestação, com média de 17 carrapatos por cão, sendo que o cão mais infestado tinha 42 carrapatos. Esses cães eram criados na área urbana e estavam infestados por *R. sanguineus s. l.*. Esses resultados corroboram Vieira *et al.* (2013), que observaram que cães da área urbana apresentaram maior percentual de infestação do que os das áreas rurais, e ainda foram altamente associados com a positividade para agentes patogênicos transmitidos por esses vetores, indicando que cães de áreas urbanas têm um maior risco de exposição a agentes patogênicos das doenças transmitidas por carrapatos comparados aos das áreas rurais. Dados semelhantes foram obtidos por Szabó *et al.* (2001) que relataram altas infestações em cães de áreas urbanas, entretanto esses autores não detectaram a presença de agentes patogênicos para seres humanos nesses carrapatos.

Também é importante observar que Paranaguá (MC) tem clima subtropical, com verões quentes, diferentemente das outras cidades estudadas (com exceção de Antonina e Matinhos) de clima temperado (IAPAR, 1994). As coletas de carrapatos dos cães dessa cidade foram realizadas no verão (fevereiro), enquanto nas outras cidades da mesorregião MC e da COP foram realizadas no inverno, primavera e verão e na CSP no inverno, que pode ter influência no grau de infestação dos cães. Porém, os carrapatos *R. sanguineus* podem ser encontrados não só em regiões tropicais e subtropicais, como também em algumas áreas temperadas (DANTAS-TORRES, 2010).

Os resultados desse trabalho demonstram a exposição dos cães para carrapatos das espécies *R. sanguineus s. l.* nas mesorregiões MC e COP, *A. aureolatum* nas mesorregiões MC, COP e CSP e *A. ovale* na mesorregião MC.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. F. C. **Epidemiologia de Rickettsias do grupo da Febre Maculosa no Estado de Mato Grosso do Sul** [Tese]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2013.

ALMEIDA, R. F. C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; SILVA, E. A.; MATOS, M. F. C.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 60, p. 63-72, 2012.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. 1. ed. Embrapa, Brasília, DF; 2013.

ARAGÃO, H.; FONSECA F. Notas de Ixodologia: IX, O Complexo ovale do gênero *Amblyomma*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, p. 131-148, 1961.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, **Brazil Rev Bras Zool**, v. 22, n. 3, p. 623-632, 2005.

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

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 8, p.1-11, 2015.

BARROS, D. M.; BAGGIO, D. Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on wild mammals in the State of Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 291-296, 1992.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Exp Appl Acarol**, v. 50, p. 361-374, 2010.

COSTA, F. R.; ROCHA, M. M. Nova dinâmica dos municípios do Paraná. **Mercator (Fortaleza)**, v. 13, n. 2, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.13, p.151-154, 2004.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasit Vectors**, v. 26, n. 3, p. 1-11, 2010.

DIPEOLU, O. O.; AKINBOADE, O. A.; OGUNJI, F.O. Observations on the epidemiology of house infesting *Rhipicephalus sanguineus* in a household in Lagos, Nigeria. **Bull Anim Hlth Prod Afr**, v. 30, p. 29-30, 1982.

FLECHTMANN, C. A. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990.

FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R. V.; BONACIM, J. E.; BIONDO, A. W.; *et al.* Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 4, p. 222-227, 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. (2003) Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. **Special Publication of the International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases-2**, Atalanta, Houten, The Netherlands, 173 pp.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; *et al.* The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010.

GUIMARÃES, L. R. Sobre alguns ectoparasitos de aves e mamíferos do litoral paranaense. **Arq Mus Paranaense**, Curitiba, p. 179-90, 1945.

HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7. ed. New York: Macmillan Publishing; 1979. 548 p.

IAPAR. **Cartas climáticas do Estado do Paraná**. Londrina, Instituto Agrônomo do Estado do Paraná, 1994. 49 p. ilustr. Epi Info [online]. 1994 [cited 2016 Dez 15]. Available from: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=597>.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; *et al.* *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. **Morphol Syst Evol**, v. 52, p. 28-37, 2015.

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

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasit Vectors**, n. 9, p. 1-15, 2016.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clín Vet**, v. 30, p. 24-32, 2001.

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

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 2, n.1, p. 75-99, 2010.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A., CAMARGO, L. M.; PETERKA, C. R.; DE C PACHECO, R.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasit Vectors**, v. 9, p. 1-14, 2016.

MARTINS, T. F.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; COSTA, F. B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. A.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon. **Brazil Exp Appl Acarol**, v. 62, p. 121-128, 2014.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 26-30, 2011.

MINEROPAR - Serviço Geológico do Paraná. **Atlas Geomorfológico do Estado do Paraná**. Escala Base: 1:250.000 com Modelos Reduzidos de 1:500.000. 2006. 63p. Epi Info [online]. 2006 [cited 2016 Dez 15]. Available from:

http://www.mineropar.pr.gov.br/arquivos/File/2_Geral/Geomorfologia/Atlas_Geomorforlogico_Parana_2006.pdf.

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

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Vet Parasitol**, v. 190, p. 547–555, 2012.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P.; MATHIAS, M. I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Vet Parasitol**, v. 129, p. 139-147, 2015.

ONOFRIO, V. C. **Revisão do gênero Amblyomma Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) no Brasil**. [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no Norte do Paraná. **Semin: Ciên Agrar**, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. **Braz J Vet Res Animal Sci**, v. 53, n.1, p. 1-31, 2016.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p. 523-530, 2006.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciênc Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; DAGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.

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

SILVA, L. J.; GALVÃO, M. A. M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, p. 197-198, 2004.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, M.; SANTOS, A. P.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 969, n. 25, p. 290-293, 2001.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOAO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar

populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet Parasitol**, v. 130, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rain forest Rickettsia, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 30, p. 1-10, 2013.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M.; FERREIRA, F. A.; PAJUABANETO, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transbound Emerg Dis**, v. 57, n. 2, p. 72-74, 2010.

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; NASCIMENTO, D. A. G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. Cambridge: CambridgeUniversity Press; 2000.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 7, p. 449-456, 2016.

3. CAPITULO 2. PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES DO PARANÁ- SUL DO BRASIL

RESUMO

Cães infectados por hemoparasitas transmitidos por carrapatos apresentam alterações clínicas e hematológicas inespecíficas e similares e isso dificulta o diagnóstico. O presente trabalho teve como objetivos descrever as alterações clínicas e hematológicas observadas nos cães com carrapato das mesorregiões geográficas: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP); determinar a sorocorrência para piroplasmas nos cães com carrapato das mesorregiões estudadas; investigar a presença de *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e outros agentes da família Anaplasmataceae nos cães; e descrever os resultados hematológicos e bioquímicos dos cães infectados com *Rangelia vitalii*, *E. canis* e agentes da família Anaplasmataceae. Cinquenta e seis cães com carrapato foram avaliados por meio da história clínica, exames físicos e hematológicos, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizado o sequenciamento genético das amostras positivas na PCR para *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp. Amostras de sangue dos 56 cães (26 cães provenientes da mesorregião MC, 29 da COP e um da CSP) foram obtidas por punção da veia cefálica ou jugular, acondicionadas em tubos estéreis: com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização do hemograma, exame de camada leucocitária e PCR; e em tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro para a sorologia. Os principais sinais clínicos observados nos cães com carrapato foram: depressão, anorexia, desidratação e febre. As principais alterações hematológicas nos cães com carrapato foram: anemia, leucocitose, neutrofilia e eosinofilia. A taxa de soropositividade no ELISA para piroplasmas foi de 76% na MC e 64,3% na COP. O cão da CSP foi soronegativo. Um cão procedente da mesorregião MC foi positivo na PCR para *Babesia* sp., contudo, o produto da PCR foi sequenciado e gerou sequências de DNA que foram 100% idênticas às amostras de *R. vitalii*; um cão da COP foi positivo na PCR para *Ehrlichia* sp., e

no sequenciamento genético a amostra revelou 100% de identidade com *E. canis*; e um cão da MC foi positivo para a família Anaplasmataceae. As principais alterações nos exames do cão infectado por *R. vitalii* foram anemia, leucocitose, neutrofilia e trombocitopenia; hipoalbuminemia e aumento nos valores de uréia, AST, GGT, bilirrubina direta e total. No cão infectado por *E. canis* verificou-se anemia, leucocitose, neutrofilia e linfocitose; hipoalbuminemia e aumento da proteína total, bilirrubina direta, globulinas e ALT. No cão positivo para a família Anaplasmataceae verificou-se eosinofilia e hipoalbuminemia. O presente estudo consiste na detecção molecular e seqüenciamento genético de *R. vitalii* no Paraná; e o primeiro sequenciamento genético de *E. canis* do Paraná.

Palavras-chave: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, família Anaplasmataceae PCR, *Rangelia vitalii*.

PATHOGENIC AGENTS TRANSMITTED BY TICKS IN DOGS FROM PARANÁ – SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Dogs infected with tick-borne hemoparasites have nonspecific and similar clinical and hematological changes and this makes diagnosis difficult. The aim of the present study was to describe the clinical and hematological changes observed in dogs with ticks from the geographic midland regions: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP); to determine the serooccurrence for piroplasms in dogs with ticks of the studied midland regions; to investigate the presence of *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. and other agents of the Anaplasmataceae family in dogs; and to describe the hematological and biochemical results of dogs infected with *Rangelia vitalii*, *E. canis* and agents of the Anaplasmataceae family. Fifty-six dogs with ticks were evaluated through clinical history, physical and

hematological exams, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). Was performed the gene sequencing of PCR positive e samples for *Ehrlichia* sp. and *Babesia* sp. Blood samples from the 56 dogs (26 dogs from the MC midland region, 29 from the COP and one from the CSP) were obtained by puncture of the cephalic or jugular vein, placed in sterile tubes: with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to perform the blood count, buffy coat and PCR; and in tubes without anticoagulant to obtain serum for serology. The main clinical signs observed in dogs with ticks were: depression, anorexia, dehydration and fever. The main hematological changes in dogs with ticks were: anemia, leukocytosis, neutrophilia and eosinophilia. The seropositivity rate in ELISA for piroplasms was 76% in MC and 64.3% in COP. The CSP dog was seronegative. A dog from the MC mesoregion was positive in the PCR for *Babesia* sp., nevertheless the PCR product was sequenced and generated DNA sequences that were 100% identical to the *R. vitalii* samples; one COP dog was positive in PCR for *Ehrlichia* sp., and in the gene sequencing of 100% identity sample with *E. canis*; and one MC dog was positive for the Anaplasmataceae family. The main alterations in the examinations of the dog infected by *R. vitalii* were anemia, leukocytosis, neutrophilia and thrombocytopenia; hypoalbuminemia and increased urea, AST, GGT, and total bilirubin levels. In the dog infected with *E. canis* the anemia, leukocytosis, neutrophilia, lymphocytosis, hypoalbuminemia and total protein increase, direct bilirubin, globulins and ALT, were observed. In the dog positive for the Anaplasmataceae family, eosinophilia and hypoalbuminemia were observed. The present study consists of the molecular detection and gene sequencing of *R. vitalii* in Paraná; and the first gene sequencing of *E. canis* from Paraná.

Keywords: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, Anaplasmatacea family, PCR, *Rangelia vitalii*.

3.1 INTRODUÇÃO

Os cães são suscetíveis à infecção por agentes transmitidos por carrapatos (ALMEIDA *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). Os carrapatos causam desconforto pela picada que produz irritação local, anemia por perda de sangue, inoculam toxinas e podem transmitir vírus, riquetsias, bactérias e protozoários (OYAFUSO *et al.*, 2002; ANDREOTTI e KOLLER, 2013). Os cães com doença transmitida por carrapato frequentemente apresentam alterações clínicas e hematológicas inespecíficas, ou nenhuma alteração, dependendo da espécie infectante, do estágio da infecção e infecção concomitante com outros agentes patogênicos transmitidos por esses vetores (SUKASAWAT *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2014). As hemoparasitoses erliquiose e babesiose são as doenças infecciosas transmitidas por carrapatos mais comuns em cães e são popularmente conhecidas como "doenças do carrapato" (ALMEIDA e ANDREOTTI, 2013).

Os canídeos podem ser infectados por vários agentes da família Anaplasmataceae (DUMLER *et al.*, 2001) como *Ehrlichia canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys*, *A. phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii* (INOKUMA *et al.*, 2001) e *N. helminthoeca* (HEADLEY *et al.*, 2006). A erliquiose monocítica canina é uma das doenças infecciosas mais graves que acometem os cães, causada por bactérias da espécie *E. canis* (DUMLER *et al.*, 2001). A bactéria infecta as células mononucleares e se replica, antes de se disseminar para outros órgãos do hospedeiro. Nesta fase, conhecida por aguda, os sinais clínicos mais observados são: febre, secreção ocular e nasal, linfadenopatia, anorexia e depressão, que pode evoluir para perda de peso, vasculite, sinais neurológicos, musculares e de poliartrite (BELLAH *et al.*, 1986). A doença pode ainda evoluir para as formas subclínica e crônica (GREENE e HARVEY, 1984).

Na infecção por espécies de Anaplasmataceae os sinais clínicos observados em cães são semelhantes aos que ocorrem em erliquiose (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998). *A. phagocytophilum* é um patógeno emergente de humanos, cães e outros animais, e é transmitido por carrapatos ixodídeos (SANTOS *et al.*, 2013). Essa bactéria é gram-negativa intracelular

obrigatória de granulócitos e infecta predominantemente neutrófilos, onde se reproduz, formando colônias chamadas mórulas, causando a anaplasose granulocítica canina (DUMLER *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2013). Os cães infectados apresentam sinais clínicos como mal-estar, letargia, febre, anorexia, fraqueza, indisposição, tensão nervosa, linfadenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia. As anormalidades hematológicas incluem trombocitopenia leve a grave e alterações de leucograma (DUMLER *et al.*, 2001). Já a anaplasose trombocítica canina, é causada pela bactéria intracelular obrigatória *A. platys*, frequentemente observada na forma de aglomerados (mórulas) nas plaquetas (DUMLER *et al.*, 2001). A principal alteração hematológica observada é a trombocitopenia, e geralmente não esta associada à anemia (GAUNT *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).

A babesiose é causada por protozoários intraeritrocitários do gênero *Babesia* sp., pertencentes a família Babesiidae, ordem Piroplasmida. Os animais infectados apresentam sinais clínicos decorrentes da multiplicação do protozoário dentro dos eritrócitos e subsequente destruição dessas células (VIAL e GORENFLOT, 2006). A doença pode manifestar-se sob as formas subclínica, aguda, hiperaguda ou crônica. Na forma aguda ocorre: anemia hemolítica, anorexia, esplenomegalia, febre, hematúria, icterícia, letargia, linfadenomegalia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e síndrome da disfunção de órgãos múltiplos. Na forma hiperaguda ocorre: acidose metabólica, choque, coagulação intravascular disseminada, estase vascular, hipóxia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e síndrome da disfunção de órgãos múltiplos. Na fase crônica ocorre diminuição do apetite e febre intermitente (VIDOTTO e TRAPP, 2004; FURLANELLO *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES e FIGUEIREDO, 2006).

Outra hemoparasitose comumente diagnosticada no sul e sudeste do Brasil é a rangeliase canina, entretanto, nas demais regiões brasileiras os casos de rangeliase são erroneamente diagnosticados como sendo outras hemoparasitoses, devido à similaridade clínica dessas doenças (LEMOS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Também conhecida como *nambyuvu*, "peste do sangue" ou "febre amarela dos cães" é uma doença hemorrágica e hemolítica transmitida por carrapatos, causada pelo protozoário *Rangelia vitalii* (PESTANA, 1910a; LORETTI e BARROS, 2005).

A rangeliose foi referenciada pela primeira vez no Brasil em 1908 e suspeitava-se que fosse causada por um piroplasma, devida sua semelhança clínica à babesiose, que também não era descrita no país ainda (CARINI, 1908). Dessa forma, *R. vitalii* foi por muito tempo descrita como *B. canis*, e a rangeliose considerada sinônimo de babesiose (FRANÇA *et al.*, 2010). De acordo com um estudo genético recente, a *R. vitalii* está filogeneticamente relacionada com espécies de *Babesia* sp. *stricto sensu* do grupo dos piroplasmas (SOARES *et al.*, 2011).

A *R. vitalii* apresenta uma fase intraeritrocitária, quando também é observada no interior de leucócitos e uma fase extraeritrocitária, que a diferencia dos demais hemoparasitas, pois se localiza no citoplasma das células endoteliais dos vasos sanguíneos (LORETTI e BARROS, 2005; SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013). Os cães infectados desenvolvem sinais clínicos semelhantes aos da babesiose e erliquiose (SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013), sendo caracterizados por anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenopatia, hemorragias ao longo do trato gastrointestinal e hemorragia persistente do pavilhão auricular, superfície externa das orelhas, nariz e cavidade oral (PESTANA, 1910a; LORETTI e BARROS, 2005; FRANÇA *et al.*, 2010, FIGHERA *et al.*, 2010).

Atualmente, o diagnóstico de *R. vitalii* é baseado na presença dos sinais clínicos típicos, observação de parasitas no esfregaço de sangue periférico (FRANÇA *et al.*, 2010), achados histopatológicos (FIGHERA *et al.*, 2010) e identificação molecular. Os testes sorológicos não estão disponíveis (SOARES *et al.*, 2011).

A detecção direta de inclusões citoplasmáticas em esfregaços de sangue pode ajudar no diagnóstico de infecções agudas causadas por agentes da família Anaplasmataceae quando aplicada com cautela e em associação com técnicas moleculares e sorológicas, não podendo ser utilizada para diagnosticar o agente etiológico (DAGNONE *et al.*, 2009). Contudo, é uma técnica utilizada nos casos onde há suspeita de infecção por *E. canis*, *Babesia* sp. e *R. vitalli*, mesmo sendo um método de baixa sensibilidade (CESAR, 2008; JOJIMA, *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2010; SILVA, *et al.*, 2014). Para que a

detecção de hemoparasitas seja possível por microscopia de luz é necessário um grande número de microorganismos circulantes (GIZZI *et al.*, 2015).

Atualmente métodos de imunodiagnóstico e de caracterização molecular estão sendo utilizados para diagnosticar hemoparasitas em cães (SILVA *et al.*, 2014). Os testes sorológicos são úteis para identificar pacientes assintomáticos e diagnosticar infecções crônicas quando o nível de parasitemia está baixo ou não detectável no esfregaço de sangue periférico (JOJIMA *et al.*, 2008). Entretanto, a sorologia é incapaz de distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia ao agente (SUKASAWAT *et al.*, 2000; CESAR, 2008). E, como existem reações cruzadas em exames sorológicos dentro do mesmo genogrupo e, potencialmente entre genogrupos, a identificação da espécie pode não ser estabelecida na maioria dos estudos clínicos que utilizem apenas a sorologia (SUKASAWAT *et al.*, 2000).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é eficaz para determinar a presença de agentes patogênicos transmitidos por carrapatos em cães (LAUMMAUNWAI *et al.*, 2014). A PCR possibilita a detecção de sequências específicas do DNA do patógeno de interesse e diferentes amostras podem ser utilizadas, como: sangue, urina ou tecidos do hospedeiro (CESAR, 2008).

Infecções concomitantes por diferentes hemoparasitas ocorrem comumente em regiões endêmicas e dificultam o diagnóstico e tratamento dos indivíduos (IRWIN, 2005). Por isso, destaca-se a necessidade de um diagnóstico molecular diferencial em cães com sinais clínicos inespecíficos (GONÇALVES *et al.*, 2014).

No Paraná, trabalhos utilizando a técnica de PCR detectaram a presença de *B. gibsoni* em cães da região norte do estado. Dois cães positivos apresentaram coinfeção com *E. canis* e dois com *Mycoplasma haemocanis* (TRAPP *et al.*, 2006). Outros estudos moleculares realizados na mesma região detectaram a presença de *E. canis* em cães domiciliados, sendo que alguns animais apresentaram coinfeção por *A. platys* (SILVA *et al.*, 2012). Também

foram diagnosticadas *B. gibsoni* e *B. canis vogeli* em amostras de sangue de cães da região norte do estado (JOJIMA *et al.*, 2008).

Um estudo molecular recente realizado com cães não domiciliados da região sudoeste do Paraná (município de Pato Branco) identificou uma prevalência de 32,9% de infecção por *A. platys* e 10,9% por *B. vogeli*; as 182 amostras testadas foram negativas para *E. canis* (RIBEIRO *et al.*, 2017). Com relação à ocorrência de rangeliose canina no Paraná, existe um relato de caso diagnosticado por exame histopatológico (SOUSA e LEITE, 2011) e outro por diagnóstico molecular (MONGRUEL *et al.*, 2017).

Provavelmente existem poucos relatos de diagnóstico de *R. vitalii* na literatura, porque o protozoário foi diagnosticado apenas na região Sul (Rio Grande do Sul, Paraná) (FRANÇA *et al.*, 2010; SOUSA e LEITE, 2011; MONGRUEL *et al.*, 2017) e Sudeste do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais) (PESTANA, 1910a; LEMOS *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013), com dois relatos em outros países, na Argentina (EIRAS *et al.*, 2014) e no Uruguai (SOARES, 2015).

Recentemente, um aumento do risco de exposição aos patógenos transmitidos por carrapatos entre cães tem sido observado em todo o mundo (GONÇALVES *et al.*, 2014). A babesiose, erliquiose, anaplasmose e outras doenças têm sido estudadas e reconhecidas pela sua importância em Saúde Pública, pois são zoonoses carrapato associadas e com relatos escassos de sua ocorrência (ALMEIDA e ANDREOTTI, 2013).

No Paraná existem poucos trabalhos que relatam as alterações clínicas e hematológicas em cães com hemoparasitoses e são raros os estudos que identificaram os agentes transmitidos por carrapatos em cães, apesar da ocorrência na região. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar as alterações clínicas e hematológicas dos cães com carrapato nas mesorregiões geográficas: Metropolitana de Curitiba (MC), Centro Oriental (COP) e Centro Sul Paranaense (CSP); determinar a sorocorrência para piroplasmas nos cães das mesorregiões estudadas; investigar a presença de *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e outros agentes da família Anaplasmataceae nesses cães; e descrever os

resultados hematológicos e bioquímicos dos cães com infecção causada por *Rangelia vitalii*, *E. canis* e agentes da família Anaplasmataceae.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Paraná- UFPR (035/2015) (ANEXO 6.1).

3.2.2 Local do estudo

O estudo foi realizado em cães procedentes das mesorregiões geográficas: Metropolitana de Curitiba (Antonina, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Curitiba, Matinhos, Paranaguá, São José dos Pinhais), Centro Oriental Paranaense (Carambeí, Castro, Ponta Grossa) e Centro Sul Paranaense (Guarapuava). As amostras foram colhidas nas residências dos proprietários, no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná - UFPR e em clínicas veterinárias particulares das mesorregiões.

Segundo a classificação de Köppen, as três mesorregiões estudadas apresentam predominantemente o clima temperado (cfb), com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C, com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e sem estação seca definida. Contudo, as cidades de Antonina, Matinhos e Paranaguá (MC) localizadas no litoral, apresentam clima subtropical (cfa), caracterizando-se por temperaturas médias, nos meses mais frios inferiores a 18°C e no mês mais quente, acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo não há uma estação seca definida (IAPAR, 1994).

3.2.3 Animais

O delineamento amostral foi de conveniência, conforme a rotina do Hospital Veterinário da UFPR e das clínicas veterinárias colaboradoras.

Foram avaliados 56 cães com carrapato, de diferentes idades, raças, machos e fêmeas. De acordo com as mesorregiões, 26 cães são procedentes da Mesorregião Metropolitana de Curitiba (MC), 29 da Mesorregião Centro Oriental Paranaense (COP) e um da Mesorregião Centro Sul Paranaense (CSP). O critério de inclusão no estudo foi a presença de carrapato na pele. Os cães foram identificados com os números 1 a 56.

3.2.4 Questionário

Os proprietários dos cães responderam um questionário durante a colheita de amostras, abordando raça, gênero e idade dos cães. Também foram obtidas informações quanto à forma de criação dos cães, se viviam em ambiente urbano ou rural e se tinham acesso a áreas de mata ou pastagens.

Os médicos veterinários realizaram o exame clínico dos cães, que constituiu da avaliação de pele e pelos, turgor cutâneo, linfonodos, tempo de preenchimento capilar, avaliação das mucosas, auscultação cardíaca e pulmonar, frequências cardíaca e respiratória, tipo de movimento respiratório, pulso e temperatura retal. Os médicos veterinários preencheram um questionário descrevendo os sinais clínicos.

3.2.5 Coleta de sangue

Amostras de sangue dos 56 cães foram obtidas por punção da veia cefálica ou jugular, acondicionadas em tubos estéreis: com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realização do hemograma, exame de camada leucocitária ("buffy coat") e PCR; e em tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro para a sorologia.

3.2.6 Exames Laboratoriais

As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor, com temperatura entre 2 e 8° C e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR para serem processadas. O processamento das amostras no laboratório não ultrapassou 24 horas do momento da colheita.

Os hemogramas dos 56 cães foram realizados em analisador hematológico automático Mindray BC 2800 Vet[®]. Foram realizadas as contagens de eritrócitos e leucócitos e determinação da hemoglobina. Os índices hematimétricos foram obtidos por cálculo (Volume Globular Médio - VGM (fL) = Volume Globular x 100/ número de eritrócitos; Concentração de Hemoglobina Globular Média - CHGM (g/dL ou %) = Hemoglobina x 100/ Volume Globular). O hematócrito foi determinado por meio da técnica de microhematócrito e as amostras de plasma obtidas após o hematócrito passaram por refratometria para determinação das concentrações da proteína plasmática total (PPT em g/dL). As extensões sanguíneas foram realizadas até duas horas após a coleta de sangue e coradas pelo método Panótico Rápido (Newprov[®]). A contagem diferencial de leucócitos (100 células) foi realizada nas extensões sanguíneas coradas, em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X).

O exame da camada leucocitária (“buffy coat”) foi realizado por meio do esfregaço de “papa” de leucócitos, obtida por centrifugação do sangue em capilares de microhematócrito. A coloração utilizada foi Panótico Rápido (Newprov[®]). Na interpretação dos hemogramas, os resultados hematológicos foram comparados com os valores de referencia para cães (MEINKOTH e CLINKENBEARD, 2000).

As amostras dos tubos sem anticoagulante foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 5 minutos, para obtenção do soro, os quais foram aliquotados em microtubos de plástico, identificados e acondicionados à -20° C até a realização da sorologia para piroplasmas.

3.2.7 Detecção de anticorpos contra piroplasmas

Amostras de soro de 54 cães foram testadas pelo método de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay” ou ensaio de imunoabsorção enzimática), utilizando o kit comercial: IMUNOTESTE[®] – BABESIA (ELISA) – CANINO da Immunodot diagnósticos[®], seguindo as instruções do fabricante (ANEXO 6.2). Amostras de soro dos cães 32 e 44 foram insuficientes para realização do ELISA.

3.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de sangue com EDTA dos 56 cães, destinadas à PCR, foram aliqüotadas em microtubos de plástico identificados, centrifugadas a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras congeladas para posterior extração do DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen[®]) de acordo com as instruções do fabricante (ANEXO 6.3). As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até a realização da PCR.

As análises de PCR para detecção de *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e agentes da família Anaplasmataceae foram realizadas no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

PCR para *Babesia* sp.

A PCR foi realizada utilizando os *primers* BAB143-16 (CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA) e BAB694-667 (GCTTGAAACACTCTARTTTCTCAAAG) de acordo com a literatura (ALMEIDA, 2011), obtendo-se um fragmento de 551 pares de bases do gene 18S rRNA de *Babesia* sp.

A reação de amplificação foi realizada com 2,5 µL do DNA, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer* e 8 µL de água estéril, formando volume final de 25 µL.

No termociclador, as condições para a PCR foram de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C, 1 minuto a 72 °C, seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os controles positivos e negativos (água Milli-Q®) foram inseridos na PCR.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ e examinados por transiluminação UV.

PCR para *Ehrlichia* sp.

As amostras de DNA foram submetidas então, a um protocolo de PCR utilizando os *primers* 330 (GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT) e 728 (CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT) de acordo com a literatura (AGUIAR *et al.*, 2007), obtendo-se um fragmento de 409 pares de bases do gene *dsb* do gênero *Ehrlichia*.

A reação de amplificação foi realizada com 2,5 µL do DNA, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer* e 8 µL de água estéril, formando volume final de 25 µL.

No termociclador, as condições para a PCR foram de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72 °C, seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os controles positivos e negativos (água Milli-Q®) foram inseridos na PCR.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ e examinados por transiluminação UV.

PCR para agentes da família Anaplasmataceae

O DNA foi submetido, então, a uma PCR utilizando os *primers* GE2F2 (GTTAGTGGCAGACGGGTGAGT) e HE3 (TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT) de acordo com a literatura (ALMEIDA, 2011), obtendo-se um fragmento de 360 pares de bases do gene 16S rRNA de praticamente todos os membros da família Anaplasmataceae (ANDERSON *et al.*, 1992; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998).

A reação de amplificação foi realizada com 2,5 µL do DNA, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer* e 8 µL de água estéril, formando volume final de 25 µL.

No termociclador, as condições para a PCR foram de 5 minutos a 94°C, 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C, 30 segundos a 72°C, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os controles positivos e negativos (água Milli-Q®) foram inseridos na PCR.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ e examinados por transiluminação UV.

3.2.9 Sequenciamento genético

Os produtos da PCR das amostras dos cães positivos para *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp. foram sequenciados.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Animais

Dos 56 cães avaliados, 29 (51,7%) eram provenientes da Mesorregião COP, 26 (46,4%) da MC e um (1,8%) da CSP; sendo 32 machos e 24 fêmeas.

As raças eram: Lhasa Apso (4), Labrador (2), Pinscher (2), Rottweiler (2), Bloodhound (1), Boxer (1), Border Collie (1), Chow Chow (1), Dachshund (1), Fila Brasileiro (1), Pequinês (1), Shih Tzu (1), Yorkshire Terrier (1) e 37 cães Sem Raça Definida (SRD).

Os animais foram separados em cinco faixas etárias: dois cães (3,6%) com menos de um ano de idade, cinco cães (8,9%) entre 1 e 2 anos, 13 cães (23,2%) entre 3 e 4 anos, quatro cães (7,1%) entre 5 e 6 anos e 14 cães (25%) com mais de 6 anos. A idade de 18 indivíduos (32,1%) não estava disponível.

3.3.2 PCR

Dos 56 cães com carrapato avaliados, três (5,3%) foram positivos na PCR para pelo menos um agente patogênico. Os resultados foram: cão 22, procedente de Curitiba (MC), positivo para *Babesia* sp.; cão 27, procedente de Ponta Grossa (COP), positivo para *Ehrlichia* sp. e cão 48, procedente de Paranaguá (MC) positivo para família Anaplasmataceae.

3.3.3 Sequenciamento genético

Os produtos da PCR dos cães 22 e 27 foram sequenciados e as seqüências obtidas foram submetidas à análise BLAST, para verificação da similaridade de seqüência no GenBank e confirmação da identidade do agente.

A amostra do cão 27 revelou 100% de compatibilidade com *E. canis* e a seqüência obtida foi a seguinte:

```
GTACAAGACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTTCCAATACTTGGT  
GAGTCTTCACTCAAAGTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAAT  
CCAAATAAGTACATAGACTTCTATTATG
```

A amostra do cão 22 foi sequenciada e depositada no GenBank (MG027583.1) (ANEXO 6.8) e ao compara-lá com as seqüências previamente depositadas, verificou-se que era 100% idêntica às amostras de *R. vitalii* do Rio

Grande do Sul, Brasil (KT323930.1), Rio de Janeiro, Brasil (KU710789.1) e Uruguai (KP202861.1).

3.3.4 Resultado sorológico para piroplasmas

A absorvância média dos soros negativos foi 0,206, resultando em um índice de corte de 0,515. A absorvância média dos soros positivos foi 0,706, aproximadamente três vezes maior do que o obtido com os soros não-infectados.

Dos 54 cães avaliados sorologicamente, 68,5% (37/54) foram positivos para piroplasmas. A sorocorrência na mesorregião MC foi de 76% (19/25) e na COP 64,3% (18/28). O cão da região CSP não apresentou anticorpos contra piroplasmas.

Os cães infectados por *R. vitalii* (cão 22), *E. canis* (cão 27) e agente da família Anaplasmataceae (cão 48) foram soropositivos para piroplasmas. Os resultados da sorocorrência de piroplasmas em cães com carrapato, dentro de cada variável, estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1. NÚMERO DE CÃES COM CARRAPATO E SOROPOSITIVOS PARA PIROPLASMAS, DE ACORDO COM O GÊNERO, IDADE E RAÇA, NO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL.

Variáveis	N	Ocorrência
Gênero		
Fêmeas	19	51,3%
Machos	18	48,6%
Idade		
Menor que 1 ano	1	2,7%
Entre 1 e 2 anos	4	10,8%
Entre 3 e 4 anos	9	24,3%
Entre 5 e 6 anos	1	2,7%
Superior a 6 anos	9	24,3%
Não disponível	13	35,1%
Raça		
Sem raça definida	26	70,3%
Com raça definida	11	29,7%

3.3.5 Sinais clínicos

Dos 56 cães com carrapato avaliados, em 42 (75%) não foram verificadas alterações clínicas no exame físico. Os sinais clínicos compatíveis aos das doenças transmitidas por carrapatos foram observados em 3/56 cães (5,4% - cão 22, cão 33 e cão 44) e estão demonstrados na TABELA 2. O cão 22 (*R. vitalii*) veio a óbito. Outros sinais que podem estar relacionados com a presença de carrapatos foram observados em três cães (5,4%): um (1,8%, cão 48) com escoriações na pele e perda de peso, um (1,8% - cão 51) com escoriações na pele e outro (1,8% - cão 18) com perda de peso, como pode ser observado na TABELA 2.

Em 8/56 (14,3%) animais observaram-se alterações clínicas relacionadas a outras enfermidades, entre elas: otite, degeneração articular, sialorréia, lesões por atropelamento, carcinoma, úlcera de córnea, piodermite e entrópio.

TABELA 2. SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM CÃES COM CARRAPATOS, RESULTADO SOROLÓGICO PARA PIROPLASMAS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR PARA *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. E FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE; E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO).

Cão	Mesorregião	Sinais clínicos	ELISA para piroplasmas	Diagnóstico molecular
18	MC	Perda de peso	Negativo	Negativo
22	MC	Depressão, anorexia, desidratação, pulso fraco, dificuldade respiratória, febre, icterícia, hemorragia na ponta da orelha, hematúria, hemoglobinúria, bilirrubinúria	Positivo	<i>R. vitalii</i>
33	MC	Depressão, anorexia, desidratação, febre, palidez de mucosas, hematoquezia e melena	Positivo	Negativo
44	COP	Depressão, anorexia, desidratação, febre, hemorragia na ponta da orelha e epistaxe	Não realizado	Negativo
48	MC	Escoriações na pele, perda de peso	Positivo	Família Anaplasmataceae
51	MC	Escoriações na pele	Positivo	Negativo

MC (Mesorregião Metropolitana de Curitiba), COP (Centro Oriental Paranaense), CSP (Centro Sul Paranaense).

No momento da avaliação clínica e coleta de sangue de alguns cães, os mesmos estavam sendo tratados, com base no histórico de presença de carrapato e suspeita clínica. O cão 27 (*E. canis*) apresentou sinais clínicos como febre, anorexia e palidez de mucosas na semana anterior a avaliação, e estava sendo tratado com doxiciclina (10mg/kg/dia). O cão 33 estava sendo tratado com doxiciclina (10mg/kg/dia) e o cão 44 com doxiciclina (10mg/kg/dia) e dipropionato de imidocarb (7 mg/kg).

No momento da coleta de sangue do cão 48 (família Anaplasmataceae) observou-se intensa infestação por carrapatos, onde foram coletados 28 da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. O carrapato do cão 22 (*R. vitalii*) era da espécie *Amblyomma aureolatum* e do cão 27 (*E. canis*) *R. sanguineus*.

Dos 37 cães soropositivos para piroplasmas, em 30 (81,1%) não foram observados alterações clínicas no momento da coleta de sangue.

3.3.6 Resultados hematológicos

Na interpretação dos hemogramas (ANEXO 6.4), os resultados hematológicos foram comparados com os valores de referência (MEINKOTH e CLINKENBEARD, 2000).

Em relação ao eritrograma, considerou-se o valor de hematócrito inferior a 37% como anemia. A anemia foi considerada leve nos cães com hematócrito de 30-37%, moderada de 20-29%, severa de 13-19% e muito severa quando foi menor que 13% (TVEDTEN, 2010). No presente estudo, a anemia foi detectada em 12/56 (21,4%) cães e classificada como leve em 6/12 (50%), moderada em 3/12 (25%), severa em 1/12 (8,3%) e muito severa em 2/12 (16,7%) cães.

Em relação à classificação da anemia pelos índices hematimétricos VGM e CHGM, verificou-se os seguintes resultados: anemia normocítica e hipocrômica (6 cães), anemia normocítica e normocrômica (2), anemia microcítica e hipocrômica (2), anemia macrocítica e hipocrômica (1) e anemia macrocítica e normocrômica (1). As alterações eritrocitárias como anisocitose e

policromatofilia discretas foram observadas em seis animais, presença de corpúsculos de Howell-Jolly em dois e poiquilocitose em dois cães.

No hemograma do cão 22 (*R. vitalii*) constatou-se anemia severa (hematócrito 17%) normocítica hipocrômica e, devido a ausência de policromatofilia, a anemia foi considerada não regenerativa; trombocitopenia (180.000 plaquetas/ μ L) e diminuição no valor da proteína total plasmática (5,2 g/dl). Verificou-se leucocitose (33.700 células/ μ L), neutrofilia com desvio nuclear de neutrófilos à esquerda regenerativo, presença de neutrófilos tóxicos (ANEXO 6.5).

No hemograma do cão 27 (*E. canis*) verificou-se anemia leve (hematócrito 34%), normocítica hipocrômica não regenerativa, leucocitose (22.500 células/ μ L) com neutrofilia, linfocitose e agregação plaquetária (ANEXO 6.6).

No hemograma do cão 48 (família Anaplasmataceae) foi observada apenas eosinofilia (ANEXO 6.7).

Entre os cães anêmicos 8/12 (66,7%) foram soropositivos para piroplasmas. Na TABELA 3 estão apresentados os resultados do eritrograma dos cães anêmicos soropositivos para piroplasmas, relacionado à presença ou ausência de sinais clínicos.

TABELA 3. ERITROGRAMA DOS CÃES ANÊMICOS SOROPOSITIVOS PARA PIROPLASMAS, ASSOCIADO AOS SINAIS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR PARA *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. E FAMÍLIA ANAPLASMATAACEAE; E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO).

Cão	Erit ($10^6/\mu$ L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VGM (fL)	CHGM (g/dL)	Alteração Clínica	Diagnóstico Molecular
20	2,32	4,8	22	67,3	31,7	Ausente	Negativo
21	2,9	6,1	18	72,4	32,3	Ausente	Negativo
22	2,2	5,1	17	76	30	Presente	<i>R. vitalii</i>
27	5,42	10,5	34	63	31	Ausente	<i>E. canis</i>
33	5,06	9,3	30	68	30,6	Presente	Negativo
34	4,93	10	32	70,1	30	Ausente	Negativo
42	4,8	9,8	34	94,8	21,8	Ausente	Negativo
54	5,05	9	33	70,3	32,4	Ausente	Negativo

Erit: eritrócitos; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média.

Três (25%) cães anêmicos foram soronegativos para piroplasmas. Em um cão (cão 11) verificou-se sinais relacionados a atropelamento, um cão (cão 19) com carcinoma e outro (cão 41) com piodermite e entrópio. No hemograma do cão 44, pode ser observada anemia, entretanto esse animal não foi avaliado sorologicamente por insuficiência de amostra, o mesmo apresentou sinais clínicos citados na TABELA 2.

Com relação às anormalidades leucocitárias, 15/56 (26,8%) cães apresentaram leucocitose, 7/56 (12,5%) com desvio à esquerda regenerativo, 12/56 (21,4%) tinham leucocitose com neutrofilia e 1/56 (1,8%) apresentou leucocitose com linfocitose; em 9/56 (16,1%) cães verificou-se eosinofilia, 2/56 (3,6%) linfocitose e 2/56 (3,6%) monocitose. Em nenhum animal nesse estudo constatou-se leucopenia.

Dos cães com leucocitose 9/15 (60%) eram soropositivos para piroplasmas, desses somente o cão 22 tinha alterações clínicas no exame físico (TABELA 2). Na TABELA 4 estão apresentados os resultados do leucograma dos cães com leucocitose e soropositivos para piroplasmas.

TABELA 4. LEUCOGRAMA DOS CÃES COM LEUCOCITOSE SOROPOSITIVOS PARA PIROPLASMAS E DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR PARA *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. E FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE; E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO).

Cão	Leucócitos	Neutrófilos	Bast	Eos	Linf	Mon	Diagnóstico
	Totais (/μL)	Segmentados (/μL)	(/μL)	(/μL)	(/μL)	(/μL)	Molecular
10	17.200	8.256	344	4988	2.924	688	Negativo
22	33.700	28.645	2359	0	1.685	0	<i>R. vitalii</i>
26	22.400	14.336	224	4928	2.240	672	Negativo
27	22.500	12.375	225	225	9.000	675	<i>E. canis</i>
29	18.000	16.200	0	540	720	540	Negativo
31	19.100	6.303	0	0	12.224	573	Negativo
34	22.300	12.934	446	2676	5352	892	Negativo
35	26.600	18.354	0	3.192	4.256	798	Negativo
54	18.200	11102	546	2548	2548	1456	Negativo

Bast: bastonetes, Eos: eosinófilos, Linf: linfócitos, Mon: monócitos.

Dos cães com leucocitose, 6/15 (40%) foram soronegativos para piroplasmas. Desses, três não tinham alterações clínicas (cão 23, 38 e 55); um

(cão 11) apresentou sinais relacionados a atropelamento, um (cão 19) com carcinoma, e outro (cão 41) com piodermite e entrópio.

Com relação ao número de plaquetas, a trombocitopenia foi observada em dois cães (3,2% - cão 22 e 44). A agregação plaquetária foi observada em sete cães (12,5%- cão 2, 5, 13, 20, 21, 27 e 41).

3.3.7 Resultados dos exames adicionais dos cães 22, 27 e 48

A seguir estão apresentados os resultados dos exames adicionais dos cães 22 (*R. vitalii*), 27 (*E. canis*) e 48 (família Anaplasmataceae), solicitados pelos clínicos durante o atendimento dos animais.

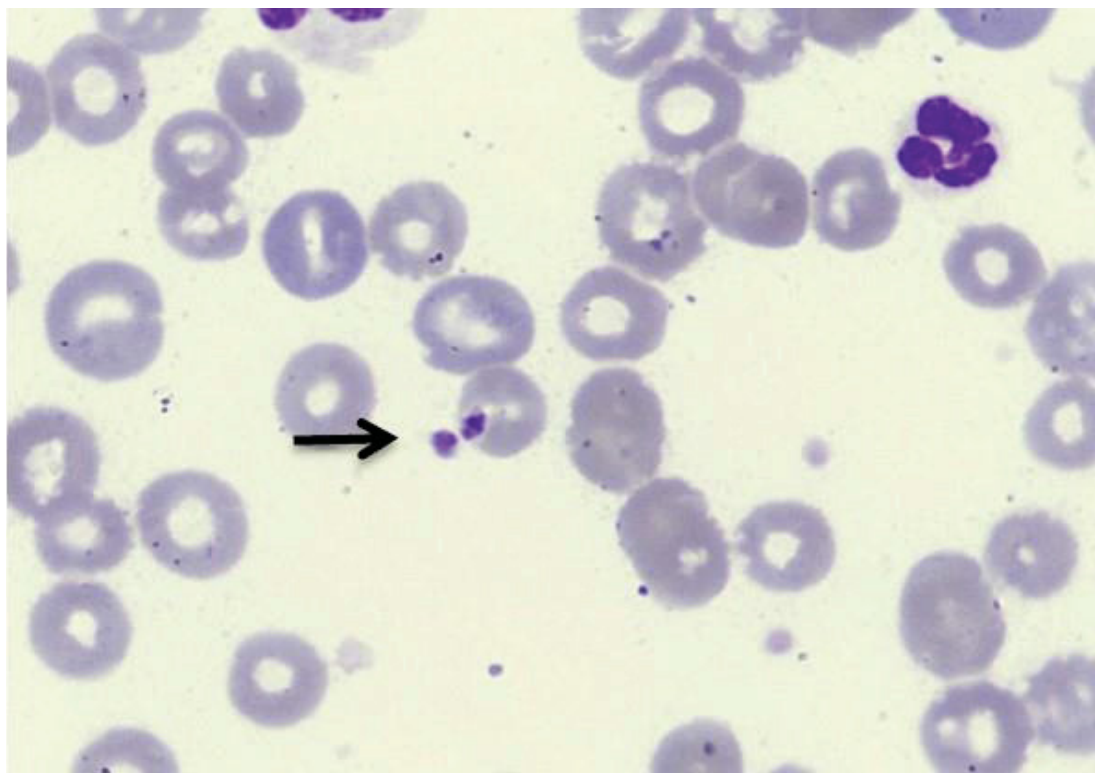
Cão 22 (*R. vitalii*):

O cão foi positivo para piroplasmas por microscopia de luz, na avaliação do esfregaço de sangue periférico. Foram observados parasitas intra-eritrocitários e parasitas de vida livre no plasma (FIGURA 1).

Nos exames bioquímicos constatou-se diminuição nos valores de proteínas totais (4,7 g/dL), hipoalbuminemia (1,2 g/dL) e aumento nos valores de uréia (129,1 mg/dL), AST (88,0 U/L), GGT (8,0 U/L), e bilirrubinas direta (3,80mg/dL) e total (3,90 mg/dL). Os valores de creatinina, FA, globulinas e bilirrubina indireta estavam dentro dos valores normais de referência (KANEKO *et al.*, 1997).

Os resultados da urinálise foram: coloração castanha, aspecto turvo, densidade 1038, pH 5,5, proteinúria (2+) bilirrubinúria (3+), hematúria (4 a 6 hemácias/ campo), raros cristais de bilirrubina, impregnação por bilirrubina (2+), raros leucócitos, raras bactérias, raras células epiteliais renais e de transição, cilindros granulosos (2 a 3/ campo), espermatozóides (2+) e raras gotículas de gordura (ANEXO 6.5).

FIGURA 1. FOTOMICROGRAFIA DE ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃO (CÃO 22) NATURALMENTE INFECTADO POR *R. vitalii* DEMONSTRANDO PRESENÇA DE PIROPLASMAS DE VIDA LIVRE E INTRA-ERITROCITÁRIO (SETA). MICROSCOPIA DE IMERSÃO (1000X). COLORAÇÃO DE ROMANOVSKY.



FONTE: O autor (2017).

Cão 27 (*E. canis*):

Nos exames bioquímicos constatou-se aumento da proteína total (7,5 g/dL), bilirrubina direta (0,19 mg/dL), globulinas (5,3 mg/dL) e ALT (117,1U/L) e hipoalbuminemia (2,2g/dL). Os valores de glicose, creatinina, uréia, FA, AST, GGT, CK, LDH, bilirrubina total e indireta estavam dentro dos valores de referência (KANEKO *et al.*, 1997).

Cão 48 (família Anaplasmataceae):

Nos exames bioquímicos verificou-se hipoalbuminemia (2,3 g/dL) e não foram observadas alterações séricas na creatinina, uréia, FA, GGT, PT e globulinas (KANEKO *et al.*, 1997).

3.4 DISCUSSÃO

Dos 56 cães com carrapato, 54 foram avaliados por ELISA (exceto os cães 32 e 44) e desses, 37 (68,5%) foram soropositivos para piroplasmas, porém, apenas um cão (1,8% - cão 22) foi positivo na PCR para *Babesia* sp.. A sorologia é incapaz de distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia ao agente (SUKASAWAT *et al.*, 2000; CESAR, 2008). Provavelmente esses cães soropositivos e negativos na PCR, tiveram contato com o agente anteriormente, mas não estavam infectados no momento da coleta de sangue, pois o DNA de *Babesia* sp. não foi detectado.

O produto da PCR do cão 22 foi enviado para seqüenciamento genético e foi 100% compatível com *R. vitalii*. Esse resultado confirma a ocorrência de reação cruzada no teste sorológico e demonstra a importância do diagnóstico molecular. Segundo Sukasawat *et al.* (2000), a identificação da espécie pode não ser estabelecida na maioria dos estudos clínicos que utilizem apenas a sorologia. A reação cruzada ocorreu porque *R. vitalii* está filogeneticamente relacionada com espécies de *Babesia* sp. *stricto sensu* do grupo dos piroplasmas (SOARES *et al.*, 2011). Dessa forma, o teste de ELISA realizado no presente estudo foi considerado como um teste sorológico para piroplasmas, e não um teste específico para *B. canis*.

Estudos prévios afirmam que testes para a determinação de anticorpos ou a pesquisa de fragmentos antigênicos de *R. vitalii* ainda não estão disponíveis comercialmente (SOARES *et al.*, 2011), porém, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, o kit IMUNOTESTE[®] – BABESIA (ELISA) – CANINO pode ser considerado um método de diagnóstico para detecção de anticorpos contra piroplasmas, incluindo *R. vitalii*. Contudo, destaca-se a necessidade da utilização de técnicas de diagnóstico molecular para a confirmação do agente.

Considerando a sorologia para piroplasmas, no presente estudo verificou-se em cães com carrapato uma sorocorrência de 76% na mesorregião MC e 64,3% na COP. O cão procedente da mesorregião CSP foi

soronegativo. Estudos sorológicos prévios obtiveram menores soroprevalências para babesiose em uma população de cães da região norte do Estado do Paraná (49,9%) (TRAPP *et al.*, 2006), e em uma população de cães com carrapato na mesma região (46,4%) (VIEIRA *et al.*, 2013). A diferença de soroprevalência encontrada em outros estudos pode ter sido devido à variação climática, população estudada e teste de diagnóstico utilizado (VIEIRA *et al.*, 2013).

Estudos prévios parasitológicos e sorológicos realizados no Brasil têm mostrado que as taxas de soropositividade para babesiose canina variam de 1,9 a 73,3% em Minas Gerais (RIBEIRO *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009), 42,4% em São Paulo (DELL'PORTO *et al.*, 1993) e 42,6% na Amazônia oriental (SPOLIDORIO *et al.*, 2013). Embora a doença esteja amplamente difundida no Brasil, é desconhecida a prevalência da infecção por *Babesia* sp. em cães, na maioria das áreas onde a doença é endêmica (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006). A maior prevalência de babesiose tem sido relatada em cães machos (IRWIN, 2005), entretanto, nesse estudo não houve diferença de prevalência para piroplasmas entre gêneros, pois a porcentagem de machos e fêmeas soropositivos foi de 51,4% e 48,6% respectivamente.

No Brasil, a forma subclínica da babesiose canina é provavelmente a apresentação predominante nos cães infectados (VIDOTTO e TRAPP, 2004). Este fato foi apoiado pelo presente trabalho, no qual 81,1% dos cães soropositivos para piroplasmas não apresentaram nenhuma alteração clínica. Além disso, estudos prévios têm mostrado que em áreas endêmicas, cães são capazes de sintetizar anticorpos contra *B. canis*, mesmo na ausência de sinais clínicos de infecção (MARTINOD *et al.*, 1986). Ainda, animais soropositivos geralmente não apresentam sinais clínicos de babesiose por um período de um ano (BRANDÃO *et al.*, 2003).

Com relação às alterações hematológicas observadas, 12/56 cães (21,4%) apresentaram anemia, essa frequência baixa, provavelmente, foi em função de se ter trabalhado com a maioria dos cães sem sintomatologia clínica. Dos cães anêmicos 8/12 foram soropositivos para piroplasmas. A alteração

hematológica mais comum encontrada em babesiose canina, assim como na rangeliose é a anemia (FIGHERA *et al.*, 2010; FURLANELLO *et al.*, 2005).

Três cães anêmicos foram soronegativos para piroplasmas (cão 11, cão 19 e cão 41), esses animais apresentaram sinais clínicos relacionados a outras enfermidades não transmitidas por carrapatos, justificando a presença de anemia. O cão 33, anêmico, com presença de sinais clínicos compatíveis com os que ocorrem em doenças transmitidas por carrapato, foi positivo na sorologia, entretanto, foi negativo nos testes de PCR para *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e família Anaplasmataceae. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que no momento da coleta de sangue, o cão já estava em tratamento.

Com relação às anormalidades leucocitárias, 15/56 (26,8%) cães apresentaram leucocitose, desses, nove (60%) eram soropositivos para piroplasmas. Em babesiose, bem como na rangeliose, diminuição e aumento na contagem de leucócitos já foram anteriormente descritos em tempos diferentes após o início da infecção (FURLANELLO *et al.*, 2005; LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010). Jojima *et al.* (2008), detectaram que 35,2% dos cães infectados por *Babesia* sp. apresentaram leucopenia. No presente estudo nenhum animal apresentou leucopenia.

Foram observadas formas intra-eritrocitárias e de vida livre de *R. vitalii* nos esfregaços de sangue periférico do cão 22. *R. vitalii* e *B. vogeli* são morfologicamente indistinguíveis, e a diferenciação de espécies é feita por PCR e sequenciamento genético (LEMOS *et al.*, 2012). No estado do Paraná, a rangeliose foi relatada em cão de Tijucas do Sul, por diagnóstico histopatológico (SOUSA e LEITE, 2011) e em cão de Campo Largo por diagnóstico molecular (MONGRUEL *et al.*, 2017). O presente estudo descreve as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas de um cão com diagnóstico molecular de *R. vitalii* procedente da cidade de Curitiba. O sequenciamento da amostra demonstrou que o protozoário, segundo o gene 18S rRNA, está conservado quando comparado as sequencias de isolados do Brasil e do Uruguai.

No presente estudo, o cão 22 (*R. vitalii*) apresentou sinais clínicos como apatia, anorexia, desidratação, icterícia e hemorragia, corroborando estudos prévios (PESTANA, 1910a; LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013). Em outro estudo a icterícia foi observada com frequência em cães com rangeliose (FIGHERA *et al.*, 2010). A hemorragia pode ocorrer devido a um déficit na hemostasia primária, que está associada à trombocitopenia e/ou à vasculopatia (PAIM *et al.*, 2012). A diátese hemorrágica na rangeliose é comumente descrita em casos de infecção natural e experimental (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; PAIM *et al.*, 2012). No cão 22 verificou-se sangramento na ponta da orelha. A hemorragia bilateral grave do pinnae é considerada característica da doença e foi observada em 14,3% dos casos, de acordo com estudos prévios (FIGHERA *et al.*, 2010). O cão 22 veio a óbito, demonstrando a gravidade da doença.

Outra característica nos casos de rangeliose é a presença de carrapatos nos cães afetados (PESTANA, 1910^a). A doença geralmente acomete os cães durante a estação quente, quando o número de carrapatos é maior (FRANÇA *et al.*, 2010). No presente estudo, o cão 22 tinha histórico de parasitismo por carrapatos e foi atendido durante o verão.

Os achados hematológicos mais comuns em rangeliose são a anemia e trombocitopenia (FIGHERA *et al.*, 2010; PAIM *et al.*, 2012b). No presente estudo, o cão 22 (*R. vitalii*) apresentou anemia não regenerativa, corroborando estudos prévios (FIGHERA *et al.*, 2010). Deve ser considerada como causa da anemia, a anemia da doença inflamatória, que está associada a várias doenças crônicas, incluindo doenças infecciosas, e suas características clinicopatológicas incluem a diminuição da meia vida dos eritrócitos, inibição do metabolismo do ferro e da eritropoese mediada pela eritropoetina na medula óssea (FRY, 2010). Esse achado também pode ser relacionado à depressão imunomediada da medula óssea, onde ocorre uma produção específica de anticorpos anti-eritrocitários (FREDO *et al.*, 2017).

No leucograma do cão 22 (*R. vitalii*) verificou-se leucocitose, neutrofilia e desvio nuclear dos neutrófilos a esquerda regenerativo. Essas alterações no

leucograma estão associadas à presença de inflamação, onde a medula óssea acelera a liberação de neutrófilos, resultando em neutrofilia, liberando também neutrófilos imaturos (desvio à esquerda). A neutropoese acelera e os neutrófilos são liberados com alterações morfológicas, denominados neutrófilos tóxicos (SCHULTZE, 2010). Na rangeliose o estímulo prolongado e acentuado da medula óssea ocorre pela presença do protozoário (FRANÇA *et al.*, 2010). O desvio nuclear de neutrófilos à esquerda também foi descrito em um estudo recente com cães infectados (FREDO *et al.*, 2017).

Com relação a contagem de plaquetas do cão 22 (*R. vitalii*) verificou-se trombocitopenia, corroborando estudos prévios (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; FREDO *et al.*, 2017). Essa alteração ocorre devido a vários mecanismos como o sequestro no baço, consumo das plaquetas, destruição imuno-mediada, vasculopatia, e disfunção plaquetária (FIGHERA *et al.*, 2010; PAIM *et al.*, 2012). A diminuição no valor da proteína total plasmática, assim como a diminuição da proteína total do cão 22, é justificada pela hemorragia e anorexia (TVEDTEN, 2010).

Nos exames bioquímicos do cão 22 (*R. vitalii*) não foram observadas alterações séricas nas dosagens de creatinina, igualmente encontrado por Costa *et al.* (2012), que avaliaram parâmetros bioquímicos de cães experimentalmente infectados com *R. vitalii*. Contudo, observou-se aumento nos valores de uréia dos três cães, que difere do trabalho citado anteriormente (COSTA *et al.*, 2012), que não observou alterações séricas nas dosagens de uréia. No presente estudo, essa alteração está provavelmente relacionada à anorexia e degradação da proteína endógena (KANEKO *et al.*, 1997).

A hipoalbuminemia, detectada no cão 22 (*R. vitalii*), ocorreu porque a albumina é uma proteína de fase aguda negativa da inflamação, cuja concentração sérica reduz nos processos infecciosos ou inflamatórios, mediada por citocinas pró-inflamatórias (CERÓN *et al.*, 2005).

Avaliando o perfil bioquímico hepático do cão 22 (*R. vitalii*) pôde-se verificar o aumento das enzimas AST e GGT, assim como o aumento das bilirrubinas total e direta. AST é uma enzima presente no citoplasma e

mitocôndria de hepatócitos e células do músculo esquelético e cardíaco (THRALL *et al.*, 2007). A elevação dessa enzima no presente estudo sugere que houve lesão e necrose hepática. Estudos prévios também relacionaram esse achado às lesões musculares e cardíacas já descritas em rangeliase (COSTA *et al.*, 2012). A elevação das concentrações de GGT associado ao aumento sérico da bilirrubina direta indicam colestase, e dessa forma, indicam a icterícia como hepática. A GGT é uma enzima encontrada principalmente nas células epiteliais biliares e seu aumento sérico esta relacionado à colestase ou hiperplasia biliar (STOCKHAM, SCOTT, 2011). Em distúrbios hepáticos em que há colestase intra-hepática grave, como em hepatopatias inflamatórias, ou quando ocorre a condição referida como colestase da sepse, as citocinas circulantes, particularmente a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral, inibem diretamente o transporte de bilirrubina no hepatócito (LEVEILLE-WEBSTER, 2004).

Na urinálise do cão 22 (*R. vitalii*) verificou-se bilirrubinúria, uma alteração indicativa de doença hepática e colestase (THRALL *et al.*, 2007). A presença de células epiteliais e cilindros na urina do cão 22 indicam a ocorrência de degeneração tubular renal (THRALL *et al.*, 2007).

Dos 56 cães testados na PCR para *Ehrlichia* sp., um (1,8% - cão 27) foi positivo e no seqüenciamento genético a amostra teve 100% de identidade com *E. canis*. No Paraná, estudos prévios utilizando a técnica de PCR detectaram *E. canis* em cães da região norte do estado (DAGNONE *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012), entretanto, o presente estudo foi o primeiro a realizar o sequenciamento de *E. canis* do Paraná.

No presente estudo, o cão 27 (*E. canis*) foi positivo na sorologia, que sugere que o cão também teve contato com algum piroplasma em outro momento, pois foi negativo na PCR para *Babesia* sp. Co-infecções por múltiplos agentes são difíceis de diagnosticar sem testes altamente sensíveis como a PCR (IRWIN, 2005). Co-infecções entre *E. canis* e outros hemoparasitas, como *Babesia* sp., *Hepatozoon* sp. e *Mycoplasma haemocanis* (BORIN *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014) em

cães já foram descritas, assim como a co-infecção por mais de uma espécie de *Ehrlichia* sp. (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998).

Um estudo sorológico realizado em uma população hospitalar da região norte do Paraná detectou 14,2% de cães soropositivos para *E. canis* e *B. canis vogeli* (TRAPP *et al.*, 2006). Outro estudo na região norte do Paraná demonstrou que 26,8% dos cães apresentaram anticorpos contra *E. canis* e *B. vogeli*, 10,8% contra *E. canis* e *A. platys* e 5,8% tinham anticorpos contra *A. platys* e *B. vogeli* (VIEIRA *et al.*, 2013). Um estudo utilizando a técnica de PCR, em cães na mesma região detectou 5,47% de coinfeção por *E. canis* e *A. platys* em cães (SILVA *et al.*, 2012).

O cão 27 (*E. canis*) teve sinais clínicos uma semana antes do atendimento pelo veterinário, segundo o proprietário. Foi iniciado o tratamento com base nos sinais clínicos e histórico da presença de carrapato. A coleta de sangue foi realizada quando o cão não apresentava sinais clínicos. Na rotina clínica o diagnóstico da erliquiose monocítica canina é baseado em achados clínicos e hematológicos característicos (SILVA *et al.*, 2012).

O hemograma do cão 27 (*E. canis*) revelou anemia normocítica e hipocrômica não regenerativa. Anemia é uma alteração observada com frequência no hemograma de cães com erliquiose, e é normalmente normocítica, normocrômica e não-regenerativa, sugerindo ausência de resposta da medula óssea, entretanto a anemia normocítica e hipocrômica já foi descrita em cães naturalmente infectados (BORIN *et al.*, 2009). Segundo Dagnone *et al.* (2001), outros achados laboratoriais frequentemente encontrados em erliquiose são trombocitopenia e leucopenia, que difere do que foi observado nesse estudo, onde o cão infectado apresentou leucocitose, neutrofilia, linfocitose e agregação plaquetária. Na região norte do Paraná 21% dos cães anêmicos e 20% dos cães com trombocitopenia apresentaram erliquiose (DAGNONE *et al.*, 2003). Contudo, estudos recentes demonstraram que a trombocitopenia não foi observada em todos os cães experimentalmente infectados com *E. canis* (GAUNT *et al.*, 2010).

O cão 48, positivo na PCR para família Anaplasmataceae, apresentou somente perda de peso e escoriações na pele. De acordo com estudos sorológicos conduzidos em áreas endêmicas, cães naturalmente infectados com *A. phagocytophilum* geralmente permanecem saudáveis e se tornam portadores assintomáticos (FOLEY *et al.*, 2001). No entanto, as manifestações clínicas, tais como febre, anorexia, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia são normalmente descritas (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998). Em cães com a doença clínica, as anormalidades hematológicas observadas são a trombocitopenia leve a grave e outras alterações leucograma (DUMLER *et al.*, 2001). Todavia, no hemograma do cão 48 verificou-se apenas eosinofilia. Segundo Young e Meadows (2010), a eosinofilia na inflamação eosinofílica ocorre devido aos fatores eosinofilopoiéticos produzidos por células T sensibilizadas por antígenos de parasitas ou alérgenos. A eosinofilia no cão 48 pode ser explicada pela alta infestação por carrapatos e pela presença do parasita da família Anaplasmataceae.

3.5 CONCLUSÃO

No presente estudo, a maioria dos cães com carrapato avaliados não apresentou alterações clínicas no exame físico. Os principais sinais clínicos observados foram: depressão, anorexia, desidratação, febre e hemorragia. As principais alterações hematológicas nesses cães foram: anemia, leucocitose, neutrofilia e eosinofilia. A taxa de soropositividade para piroplasmas foi de 76% na MC e 64,3% na COP. O cão da CSP foi soronegativo. Um cão da mesorregião MC estava infectado por *R. vitalii*; um cão da COP por *E. canis*; e um cão da MC por agente da família Anaplasmataceae.

O cão com rangeliose apresentou apatia, anorexia, febre, desidratação, icterícia e hemorragia. As principais alterações hematológicas observadas foram anemia, leucocitose, neutrofilia, desvio nuclear dos neutrófilos à esquerda regenerativo e trombocitopenia; assim como, a presença de piroplasmas de vida livre e intra-eritrocitários no esfregaço de sangue periférico. Na avaliação bioquímica observou-se hipoalbuminemia e diminuição

nos valores de proteínas totais e aumento nos valores de uréia, AST, GGT, bilirrubina direta e total. O cão veio a óbito.

O cão infectado por *E. canis* estava em tratamento, não apresentando alterações clínicas no exame físico; no hemograma verificou-se anemia leve, leucocitose, neutrofilia e linfocitose. Nos exames bioquímicos constatou-se hipoalbuminemia e aumento da proteína total, bilirrubina direta, globulinas e ALT.

O cão positivo para família Anaplasmataceae tinha sinais de perda de peso e escoriações na pele, e nos exames verificou-se eosinofilia e hipoalbuminemia.

O presente estudo descreve as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas de cães naturalmente infectados por agentes transmitidos por carrapatos, que foram diagnosticados por detecção molecular, e seqüenciamento genético nos casos de infecção por *R. vitalii* e *E. canis*. Vale ressaltar que o presente trabalho consiste no primeiro sequenciamento genético de *E. canis* do Paraná. Os resultados obtidos indicam um risco para a exposição de cães para esses agentes nas mesorregiões estudadas.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 80 p. Dissertação de Mestrado.

ALMEIDA, R. F. C.; ANDREOTTI, R. Principais doenças transmitidas por carrapatos no Brasil. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. Embrapa, Brasília, DF, p.33-49, 2013.

ALMEIDA, R. F. C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; SILVA, E. A.; MATOS, M. F. C.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the

state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 60, p. 63-72, 2012.

ANDERSON, B. E.; SUMNER, J. W.; DAWSON, J. E.; TIZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B. OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H. Detection of the etiologic agent of human Ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. 1. ed. Embrapa, Brasília, DF; 2013.

BELLAH, J. R.; SHULL, R. M.; SELCER, E. V. S. Ehrlichia canis-related polyarthritis in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v.189, n.08, p.922-923, 1986.

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

BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA M. K.; MYIASHIRO, S. I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Vet Parasitol**, v. 114, p. 253-265, 2003.

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

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Vet Méd**, v. 22, p. 459-462, 1908.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Vet Clin Pathol**, v. 34, p. 85-99, 2005.

CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 57 p. Dissertação de Mestrado.

COSTA, M. M.; FRANÇA, R. T.; SILVA, A. S.; PAIM, C. B.; PAIM, F.; AMARAL, C. H.; DORNELLES, G. L.; CUNHA, J. P. M. C. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; MAZZANTI, C. M. A.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 3, p. 243-248, 2012.

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

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

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

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

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M. R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.

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*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

EIRAS, D. F.; CRAVIOTTO, M. B.; BANETHC, G.; MORÉ, G. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangellosis) in Argentina. **Parasitol Int**, v. 63, p. 729–734, 2014.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T.M.; KOMMERS, G. G.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalli* em 35 cães (1985-2009). **Pesqui Vet Bras**, v. 30, p. 974-987, 2010.

FOLEY, J. E.; FOLEY, P.; MADIGAN, J. E. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. **Am J Vet Res**, v. 62, p. 15991- 605, 2001.

FRANÇA, R. T.; SILVA, A. S.; PAIM, F. C.; COSTA, M. M.; SOARES, J. F.; MAZZANTI, C. M.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalli* in dogs in Southern Brazil. **Comp Clin Path**, v. 19, p. 383-387, 2010.

FREDO, G.; LEITE-FILHO, R. V.; PIETZSCH, C. A.; ANDRADE, C. P.; DUDA, N. C. B.; NASCIMENTO, L. C. *et al.* Rangellosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Cienc Rural**, v. 47, 2017.

FRY, M. M. Anemia of inflammatory, neoplastic, renal and endocrine diseases. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA; 2010.

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

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. P. V. P.; CHANDRASHEKAR, R. *et al.* Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasit Vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.

GIZZI, A. B. R.; CONRADO, F. O.; BIONDO, A. W.; POWOLNY, D.; LEUTENEGGER, C.; OLIVEIRA, S. T. PCR quantitativa (qPCR) no diagnóstico de doenças infecciosas em cães e gatos- revisão de literatura. **Clín Vet**, n. 117, p. 78-94, 2015.

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

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine Ehrlichiosis. In GREENE, C.E. (ed): **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia, W.B. Saunders, p.545-561, 1984.

GUIMARÃES, A.; M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Rev Bra Parasitol Vet**, v. 18, n. 1, p. 49-53, 2009.

HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G.; BARAT, N. C.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J. S. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1303-1304, 2006.

IAPAR. **Cartas climáticas do Estado do Paraná**. Londrina, Instituto Agrônomo do Estado do Paraná, 1994. 49 p. ilustr. Epi Info [online]. 1994 [cited 2016 Dez 15]. Available from: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=597>.

INOKUMA, H. *et al.* Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **J Vet Med Sci**, v. 63, n. 7, p. 815-817, 2001.

IRWIN, P. Babesiosis and cytauxzoonosis. In: SHAW, S. E.; DAY, M. J. Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. **Manson Publishing**, Barcelona, p. 63-77, 2005.

JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C.; BALARIN, M. R. S.; FABRETTI, A. K.; GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

LAUMMAUNWAI, P.; SRIRAJ, P.; AUKKANIMART, R.; BOONMARS, T.; BOONJARASPINYO, S.; SANGMANEEDET, S.; *et al.* Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 45, n. 5, p. 1157-1166, 2014.

LEMOS, T. D.; CERQUEIRA, A. M.; TOMA, H. K.; SILVA, A. V.; CORREA, R. G.; PALUDO, G. R.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, p. 137-142, 2012.

LEVEILLE-WEBSTER, C. R. Diagnóstico laboratorial de doenças hepatobiliares. In: Ettinger SJ, Feldman EC. In: **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 141, p. 1348-1363; 2004.

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

MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and Immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 19, p. 245-254, 1986.

MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal Hematology of the Dog. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 163, p.1057-1063, 2000.

MONGRUEL, A. C. B.; SOUSA, M. G.; VALENTE, J. D. M.; BARBOSA, I. C.; SPANHOL, V. C.; SEZYSHTA, A.; WEBER, L. F. S.; STEDILE, S. T. O.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. First report of *Rangelia vitalii* in a dog from Parana State, Southern Brazil. **Arch Vet Sci**, v. 22, n. 4, p. 139-144, 2017.

MOREIRA, M. V. L.; GUIMARÃES, L. B.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R.; ECCO, R. Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. **Arch Vet Sci**, v. 18, n. 2, p. 637-639, 2013.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; PASSOS, L. M. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 55, n. 2, 2003.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no Norte do Paraná. **Semin: Ciên Agrár**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

PAIM, C. B.; PAIM, F. C.; SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; COSTA, M. M.; LEAL, C. A. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; SCHETINGER, M. R. C.; MAZZANTI, A.; MAZZANTI, C. M.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. Trombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Vet Parasitol**, v. 185, p.131-137, 2012.

PESTANA, B. R. O nambyuvú. **Rev Soc Científ São Paulo**, v. 5, p. 14-17, 1910a.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T.; BONES, E. R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesq Vet Bras**, v. 37, n.2, 2017.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 42, n. 6, p. 511-517, 1990.

RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON E. *Babesia canis* (Piana & Galli- Valerio, 1895) (Apicomplexa: Babesiidae) em cães de rua do Município de Juiz de Fora, MG. **Rev Bras Med Vet**, v. 24, n. 1, p. 17-21, 2002.

SANTOS, H. A.; THOMÉ, S. M.; BALDANI, C. D.; SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; PIRES, M. S.; VITARI, G. L.; COSTA, R. L.; SANTOS, T. M.; ANGELO, I. C.; SANTOS, L. A.; FACCINI, J. L.; MASSARD, C. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 348-448, 2013.

SCHULTZE, A. E. Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. (6 ed): **Schalm's Veterinary Hematology**, Iowa: Blackwell Publishing; 2010.

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

SILVA, A. S.; MARTINS, D. B.; SOARES, J. F.; FRANÇA, R. T. Canine rangellosis: the need for differential diagnosis. **Parasitol Res**, v. 112, p. 1329-1332, 2013.

SILVA, G. C. F.; BENITEZ, A. N.; GIROTTA, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Occurrence of

Ehrlichia canis and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A.; MUNDIM, M. J. S.; GUIMARÃES, E. C. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Biosci J**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 892-900, 2014.

SOARES, J. F. *et al.* Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Vet Parasitol**, v. 210, n.1-2, p.98-101, 2015.

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

SOARES, J. F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P. E.; SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; LABRUNA, M. B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 180, p. 203-208, 2011.

SOUSA, R. S.; LEITE, N. C. *Rangelia vitalii* em um cão no estado do Paraná-Brasil: relato de caso. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 15., Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 1., 2011. Goiânia, **Anais Goiânia: ENAPAVE**, 2011.

SPOLIDORIO, M. G.; MINERVINO, A. H. H.; VALADAS, S. Y. O. B.; SOARES, H. S.; NEVES, K. A. L.; LABRUNA, M. B.; RIBEIRO, M. F. B.; GENNARI, S. M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 214-219, 2013.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

SUKASAWAT, J.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med**, v.14, p.50-55, 2000.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; *et al.* **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca; 2007.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet Parasitol**, v. 140, p. 223-230, 2006.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (6 ed): **Schalm's Veterinary Hematology**, Iowa, Blackwell Publishing, p. 152-161, 2010.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemoteraphy against babesiosis. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 138, n. 1/2, p. 147-160, 2006.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, suplemento 1, 2004.

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; NASCIMENTO, D. A. G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013.

YOUNG, K. M.; MEADOWS, R. L. Eosinophils and Their Disorders. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 163, p.1057-1063, 2000.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foram identificados carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale* em cães do Paraná. Verificou-se que os carrapatos *R. sanguineus*, ocorreram em cães de áreas urbanas e os carrapatos do gênero *Amblyomma* sp. em cães de áreas rurais e de áreas urbanas com acesso a áreas de mata.

No presente trabalho foi realizado o diagnóstico molecular e seqüenciamento genético do protozoário *Rangelia vitalii* em cão no Paraná e foi seqüenciado pela primeira vez o DNA de *Ehrlichia canis* do estado. Foram obtidos dados de sorocorrência para piroplasmas em cães com carrapato, ainda não descritos no estado.

Os resultados desse estudo indicam um risco para a exposição dos cães para carrapatos das espécies *R. sanguineus s. l.*, *A. aureolatum* e *A. ovale*, assim como para agentes transmitidos por eles, como a *R. vitalii*, *B. canis*, *E. canis* e agentes da família Anaplasmatacea, nas mesorregiões estudadas.

Entretanto, mais pesquisas devem ser realizadas visando ampliar o conhecimento dos carrapatos que ocorrem em cães nas outras mesorregiões do estado, bem como a prevalência dos agentes transmitidos por esses vetores. E como este trabalho foi focado na identificação das espécies de

carrapatos que ocorrem na região, futuros estudos devem ser realizados envolvendo a pesquisa de agentes patogênicos presentes nesses ectoparasitos.

5. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 80 p. Dissertação de Mestrado.

ALMEIDA, R. F. C. **Epidemiologia de Rickettsias do grupo da Febre Maculosa no Estado de Mato Grosso do Sul** [Tese]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2013.

ALMEIDA, R. F. C.; ANDREOTTI, R. Principais doenças transmitidas por carrapatos no Brasil. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. Embrapa, Brasília, DF, p.33-49, 2013.

ALMEIDA, R. F. C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; SILVA, E. A.; MATOS, M. F. C.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 60, p. 63-72, 2012.

ALMEIDA, R. F. C.; MATIAS, J.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; ANDREOTTI, R. (2012a). **Importância dos carrapatos na transmissão da Febre Maculosa Brasileira**. Embrapa, Brasília, DF, 2012.

ANDERSON, B. E.; SUMNER, J. W.; DAWSON, J. E.; TIZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B. OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H. Detection of the etiologic agent of human Ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, controle e doenças transmitidas**. 1. ed. Embrapa, Brasília, DF; 2013.

ARAGÃO, H.; FONSECA F. Notas de Ixodologia: IX, O Complexo ovale do gênero *Amblyomma*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, p. 131-148, 1961.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, **Brazil Rev Bras Zool**, v. 22, n. 3, p. 623-632, 2005.

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

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 8, p.1-11, 2015.

BARROS, D. M.; BAGGIO, D. Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on wild mammals in the State of Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 291-296, 1992.

BELLAH, J. R.; SHULL, R. M.; SELCER, E. V. S. *Ehrlichia canis*- related polyarthritis in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v.189, n.08, p.922-923, 1986.

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

BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA M. K.; MYIASHIRO, S. I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Vet Parasitol**, v. 114, p. 253-265, 2003.

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

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K. R.; SZABÓ, M. P.; FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Exp Appl Acarol**, v. 50, p. 361-374, 2010.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Vet Méd**, v. 22, p. 459-462, 1908.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Vet Clin Pathol**, v. 34, p. 85-99, 2005.

CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 57 p. Dissertação de Mestrado.

COSTA, F. R.; ROCHA, M. M. Nova dinâmica dos municípios do Paraná. **Mercator (Fortaleza)**, v. 13, n. 2, 2014.

COSTA, M. M.; FRANÇA, R. T.; SILVA, A. S.; PAIM, C. B.; PAIM, F.; AMARAL, C. H.; DORNELLES, G. L.; CUNHA, J. P. M. C. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; MAZZANTI, C. M. A.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 3, p. 243-248, 2012.

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

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

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

DANIELS, J. B. Molecular diagnostics for infectious disease in small animal medicine: an overview from the laboratory. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.43, n. 6, p. 1373-1384, 2013.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasit Vectors**, v. 26, n. 3, p. 1-11, 2010.

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

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, p. 1151-154, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 22, n. 7, p. 1-25, 2014.

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M. R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.

DIPEOLU, O. O.; AKINBOADE, O. A.; OGUNJI, F.O. Observations on the epidemiology of house infesting *Rhipicephalus sanguineus* in a household in Lagos, Nigeria. **Bull Anim Hlth Prod Afr**, v. 30, p. 29-30, 1982.

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*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

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

FIGHERA, R. A; SOUZA, T.M; KOMMERS, G. G.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesqui Vet Bras**, v. 30, p. 974-987, 2010.

FLECHTMANN, C. A. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990.

FOLEY, J. E.; FOLEY, P.; MADIGAN, J. E. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. **Am J Vet Res**, v. 62, p. 15991- 605, 2001.

FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R. V.; BONACIM, J. E.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 4, p. 222-227, 2010.

FRANÇA, R. T.; SILVA, A. S.; PAIM, F. C.; COSTA, M. M.; SOARES, J. F.; MAZZANTI, C. M.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalii* in dogs in Southern Brazil. **Comp Clin Path**, v. 19, p. 383-387, 2010.

FREDO, G.; LEITE-FILHO, R. V.; PIETZSCH, C. A.; ANDRADE, C. P.; DUDA, N. C. B.; NASCIMENTO, L. C. *et al.* Rangelirosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Cienc Rural**, v. 47, 2017.

FRY, M. M. Anemia of inflammatory, neoplastic, renal and endocrine diseases. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA; 2010.

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

GASSER, R. B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Vet Parasitol**, v. 136, p. 69-89, 2006.

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. P. V. P.; CHANDRASHEKAR, R. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasit Vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.

GIZZI, A. B. R.; CONRADO, F. O.; BIONDO, A. W.; POWOLNY, D.; LEUTENEGGER, C.; OLIVEIRA, S. T. PCR quantitativa (qPCR) no diagnóstico de doenças infecciosas em cães e gatos- revisão de literatura. **Clín Vet**, n. 117, p. 78-94, 2015.

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

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine Ehrlichiosis. In GREENE, C.E. (ed): **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia, W.B. Saunders, p.545-561, 1984.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. (2003) Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. **Special Publication of the International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases-2**, Atalanta, Houten, The Netherlands, 173 pp.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010.

GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Rev Bra Parasitol Vet**, v. 18, n. 1, p. 49-53, 2009.

GUIMARÃES, L. R. Sobre alguns ectoparasitos de aves e mamíferos do litoral paranaense. **Arq Mus Paran**, Curitiba, p. 179-90, 1945.

HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7. ed. New York: Macmillan Publishing; 1979. 548 p.

HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G.; BARAT, N. C.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J. S. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1303-1304, 2006.

IAPAR. **Cartas climáticas do Estado do Paraná**. Londrina, Instituto Agrônomo do Estado do Paraná, 1994. 49 p. ilustr. Epi Info [online]. 1994 [cited 2016 Dez 15]. Available from: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=597>.

INOKUMA, H. *et al.* Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **J Vet Med Sci**, v. 63, n. 7, p. 815-817, 2001.

IRWIN, P. Babesiosis and cytauxzoonosis. In: SHAW, S. E.; DAY, M. J. Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. **Manson Publishing**, Barcelona, p. 63-77, 2005.

JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C.; BALARIN, M. R. S.; FABRETTI, A. K.; GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 1, p. 277-283, 2008.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

KIRTZ, G.; LEIDINGER, E. In-clinic diagnosis of canine anaplasmosis based on haematological abnormalities and evaluation of a stained blood smear. **Tierärztl Praxis Kleintiere**, v. 43, n. 2, p. 101-106, 2015.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. **Morphol Syst Evol**, v. 52, p. 28-37, 2015.

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

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasit Vectors**, n. 9, p. 1-15, 2016.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clín Vet**, v. 30, p. 24-32, 2001.

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

LAUMMAUNWAI, P.; SRIRAJ, P.; AUKKANIMART, R.; BOONMARS, T.; BOONJARASPINYO, S.; SANGMANEEDET, S.; POTCHIMPLEE, P.;

KHIANMAN, P.; MALEEWONG, W. Molecular detection and treatment of tick-borne pathogens in domestic dogs in Khon Kaen, northeastern Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 45, n. 5, p. 1157-1166, 2014.

LEMOS, T. D.; CERQUEIRA, A. M.; TOMA, H. K.; SILVA, A. V.; CORREA, R. G.; PALUDO, G. R.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, p. 137-142, 2012.

LEVEILLE-WEBSTER, C. R. Diagnóstico laboratorial de doenças hepatobiliares. In: Ettinger SJ, Feldman EC. In: **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 141, p. 1348-1363; 2004.

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

MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and Immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 19, p. 245-254, 1986.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A., CAMARGO, L. M.; PETERKA, C. R.; DE C PACHECO, R.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasit Vectors**, v. 9, p. 1-14, 2016.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 2, n.1, p. 75-99, 2010.

MARTINS, T. F.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; COSTA, F. B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. A.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon. **Brazil Exp Appl Acarol**, v. 62, p. 121-128, 2014.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **Hora Vet**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 26-30, 2011.

MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal Hematology of the Dog. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 163, p.1057-1063, 2000.

MENDONÇA, C. S.; MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S.; MORO, T. V. Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosci J**, v. 21, p. 167-174, 2005.

MINEROPAR - Serviço Geológico do Paraná. **Atlas Geomorfológico do Estado do Paraná**. Escala Base: 1:250.000 com Modelos Reduzidos de 1:500.000. 2006. 63p. Epi Info [online]. 2006 [cited 2016 Dez 15]. Available from:

http://www.mineropar.pr.gov.br/arquivos/File/2_Geral/Geomorfologia/Atlas_Geomorforlogico_Parana_2006.pdf.

MONGRUEL, A. C. B.; SOUSA, M. G.; VALENTE, J. D. M.; BARBOSA, I. C.; SPANHOL, V. C.; SEZYSHTA, A.; WEBER, L. F. S.; STEDILE, S. T. O.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. First report of *Rangelia vitalii* in a dog from Parana State, Southern Brazil. **Arch Vet Sci**, v. 22, n. 4, p. 139-144, 2017.

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

MOREIRA, M. V. L.; GUIMARÃES, L. B.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R.; ECCO, R. Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. **Arch Vet Sci**, v. 18, n. 2, p. 637-639, 2013.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; PASSOS, L. M. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 55, n. 2, 2003.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Vet Parasitol**, v. 190, p. 547–555, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. **Braz J Vet Res Animal Sci**, v. 53, n.1, p. 1-31, 2016.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P.; MATHIAS, M. I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Vet Parasitol**, v. 129, p. 139-147, 2015.

ONOFRIO, V. C. **Revisão do gênero Amblyomma Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) no Brasil**. [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no Norte do Paraná. **Semin: Ciên Agrár**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

PAIM, C. B.; PAIM, F. C.; SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; COSTA, M. M.; LEAL, C. A. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; SCHETINGER, M. R. C.; MAZZANTI, A.; MAZZANTI, C. M.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. Trombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalli*. **Vet Parasitol**, v. 185, p.131-137, 2012.

PESTANA, B. R. O nambyuvú. **Rev Soc Científ São Paulo**, v. 5, p. 14-17, 1910a.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p. 523-530, 2006.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T.; BONES, E. R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesq Vet Bras**, v. 37, n.2, 2017.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. Frequency of anti-*Babesia canis* antibodies in dogs, in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 42, n. 6, p. 511-517, 1990.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciênc Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; DAGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.

RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON E. *Babesia canis* (Piana & Galli- Valerio, 1895) (Apicomplexa: Babesiidae) em cães de rua do Município de Juiz de Fora, MG. **Rev Bras Med Vet**, v. 24, n. 1, p. 17-21, 2002.

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

SANTOS, H. A.; THOMÉ, S. M.; BALDANI, C. D.; SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; PIRES, M. S.; VITARI, G. L.; COSTA, R. L.; SANTOS, T. M.; ANGELO, I. C.; SANTOS, L. A.; FACCINI, J. L.; MASSARD, C. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 348-448, 2013.

SCHULTZE, A. E. Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. (6 ed): **Schalm's Veterinary Hematology**, Iowa: Blackwell Publishing; 2010.

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

SILVA, A. S.; MARTINS, D. B.; SOARES, J. F.; FRANÇA, R. T. Canine rangelioidosis: the need for differential diagnosis. **Parasitol Res**, v. 112, p. 1329-1332, 2013.

SILVA, G. C. F.; BENITEZ, A. N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. 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, L. J.; GALVÃO, M. A. M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, p. 197-198, 2004.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A.; MUNDIM, M. J. S.; GUIMARÃES, E. C. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Biosci J**, Uberlandia, v. 30, n. 2, p. 892-900, 2014.

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

SOARES, J. F. et al. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Vet Parasitol**, v. 210, n.1-2, p.98-101, 2015.

SOARES, J. F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P. E.; SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; LABRUNA, M. B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 180, p. 203-208, 2011.

SOUSA, R. S.; LEITE, N. C. *Rangelia vitalii* em um cão no estado do Paraná-Brasil: relato de caso. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 15., Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 1., 2011. Goiânia, **Anais Goiânia: ENAPAVE**, 2011.

SPOLIDORIO, M. G.; MINERVINO, A. H. H.; VALADAS, S. Y. O. B.; SOARES, H. S.; NEVES, K. A. L.; LABRUNA, M. B.; RIBEIRO, M. F. B.; GENNARI, S. M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 214-219, 2013.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

SUKASAWAT, J.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med**, v.14, p.50-55, 2000.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, M.; SANTOS, A. P.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 969, n. 25, p. 290-293, 2001.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOAO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet Parasitol**, v. 130, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rain forest Rickettsia, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 30, p. 1-10, 2013.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M.; FERREIRA, F. A.; PAJUABANETO, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transbound Emerg Dis**, v. 57, n. 2, p. 72-74, 2010.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; *et al.* **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca; 2007.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet Parasitol**, v. 140, p. 223-230, 2006.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (6 ed): **Schalm's Veterinary Hematology**, Iowa, Blackwell Publishing, p. 152-161, 2010.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 138, n. 1/2, p. 147-160, 2006.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, suplemento 1, 2004.

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; NASCIMENTO, D. A. G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 7, p. 449-456, 2016.

YOUNG, K. M.; MEADOWS, R. L. Eosinophils and Their Disorders. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 163, p.1057-1063, 2000.

6. ANEXOS

6.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 035/2015, referente ao projeto “Doenças transmitidas por carrapatos em cães no Paraná”, sob a responsabilidade de **Rosângela Locatelli Dittrich** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, em reunião de 27/05/2015


Vigência do projeto	01/06/2015 a 01/12/2016
Espécie/Linhagem	Canina
Número de animais	120 (cento e vinte animais)
Peso/Idade	Variada
Sexo	Ambos
Origem	Cães atendidos na rotina do Hospital Veterinário da UFPR e das clínicas

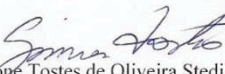
CERTIFICATE

We certify that the protocol number 035/2015, regarding the project “Tick-borne diseases in dogs in Paraná”, under **Rosângela Locatelli Dittrich** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), in session of 05/27/2015

Duration of the project	06.01.2015 to 12.01.2016
Specie/Line	Canine
Number of animals	120 (one hundred and twenty animals)
Weight/Age	Varied
Sex	Both
Origin	Dogs served in the routine of the Veterinary Hospital of UFPR and clinics

Curitiba, 27 de Maio de 2015.


Ananda Portella Félix
Presidente CEUA-SCA


Simone Tostes de Oliveira Stedile
Vice-Presidente CEUA-SCA

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR

6.2 METODOLOGIA DO ELISA PARA PIROPLASMAS

IMUNOTESTE[®] – BABESIA (ELISA) – CANINO da Imunodot diagnósticos[®]

Nos orifícios da microplaca de ELISA contendo proteína recombinante de *B. canis*, foram adicionados os controles positivo e negativo, assim como 100 µL de cada amostra diluída (2:200) em PBS Tween 20 (solução salina tamponada com fosfato, água destilada e tween). Após 1 hora de incubação a 37°C em câmara úmida, foram realizadas três lavagens com PBS Tween 20. Após a secagem, 100 µL de conjugado anti-IgG de cão (diluído 1: 9 em PBS Tween 20) foram adicionados a cada poço e depois incubado durante 1 hora a 37°C em câmara úmida. Em seguida, foi repetido o processo de lavagem e secagem. Adicionou-se 100 µL de um substrato apropriado e a microplaca foi incubada por 40 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Foram então adicionados 50 µL de solução de parada da reação e em seguida a absorbância a 405 nm foi lida utilizando um leitor de microplaca de ELISA.

O índice de corte (IC) foi obtido pela média da densidade óptica (DO) do soro controle negativo multiplicada pelo fator 2,5. As amostras que apresentaram coloração amarela intensa e DO igual ou maior ao IC foram consideradas positivas e as que não apresentaram coloração amarela intensa e DO menor que o IC foram consideradas negativas.

6.3 METODOLOGIA DA EXTRAÇÃO DE DNA

Extração com PureLink® Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen™

Adicionar 200 µl de PBS, ressuspensando as células;

Adicionar 20 µl de proteinase K;

Adicionar 20 µl de RNase A, misturar rapidamente utilizando o vortex e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;

Adicionar 200 µl de PureLink® Genomic Lysis e misturar em vortex para obter uma solução homogênea;

Incubar a 55°C durante 10 minutos para promover a digestão das proteínas;

Adicionar 200 µl de etanol 96-100% e misturar bem com vortex durante 5 segundos para obter uma solução homogênea;

Colocar o material (~640 µl) na coluna de rotação (PureLink® Spin Column); Centrifugar a coluna a 9.800 g por 1 minuto;

Descartar o tubo coletor contendo o líquido filtrado pela coluna e rotação e colocar a coluna em novo tubo de coleta para as próximas 2 lavagens;

Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 1 previamente preparado com etanol; Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 9.800 g por 1 minuto;

Descartar o tubo de coleta novamente e colocar a coluna de rotação em um tubo de coleta novo;

Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 2 previamente preparado com etanol; Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 9.800 g por 3 minutos;

Descartar o tubo de coleta novamente;

Colocar a coluna de rotação em microtubo estéril e identificado;

Adicionar 25 – 200 µl de tampão de eluição genômica PureLink® na coluna de rotação; (Utilizado 100 µl)

Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.

Centrifugar a coluna a 9.800 g por 1 minuto à temperatura ambiente (neste tubo contém DNA genômico purificado);

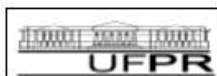
Para recuperar mais DNA pode realizar um segundo passo do ítem 17, fazendo nova centrifugação com o tampão de eluição genômica PureLink®; Armazenar o DNA purificado a – 20°C.

6.4 HEMOGRAMA E PPT DOS CÃES COM CARRAPATO

Cão	Erit. (milhões/ μ L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VGM	CHGM	Leuc. Totais (/ μ L)	Neut. Seg. (/ μ L)	Bast. (/ μ L)	Linf. (/ μ L)	Eos. (/ μ L)	Mon. (/ μ L)	Plaquetas (/ μ L)	PPT (g/dL)
1	7,79	17,1	47	60,3	36,4	6000	2820	60	2880	240	0	672000	8,6
2	8,60	18,6	58	67,4	32,1	16100	7406	161	4991	3220	322	Agregados	9,0
3	7,69	16,2	50	65,0	32,4	8600	5504	0	2236	602	258	485000	7,8
4	7,55	16,0	50	66,2	32,0	12300	7503	0	1599	2460	738	428000	7,8
5	7,30	14,6	44	60,3	33,2	10200	7956	0	1326	408	510	Agregados	7,0
6	6,83	14,6	46	67,3	31,7	9200	6164	92	1932	552	460	563000	8,0
7	5,39	12,6	39	72,4	32,3	14700	8526	0	3234	2205	735	600000	7,0
8	6,75	14,7	44	65,2	33,4	12700	7366	0	3683	1270	381	524000	7,0
9	7,46	17,1	52	69,7	32,9	6000	4140	0	1320	300	240	180000	8,2
10	6,79	14,7	47	69,2	31,3	17200	8256	344	2924	4988	688	448000	6,8
11	3,81	7,7	28	73,5	27,5	24600	19188	492	2952	246	1722	510000	5,8
12	6,58	14,1	45	68,4	31,3	13300	11039	0	1064	665	532	328000	8,8
13	8,60	17,3	52	60,5	33,3	6350	3747	127	1270	953	254	Agregados	8,0
14	7,06	14,7	48	68,0	30,6	13000	5850	0	4680	2340	130	260000	7,0
15	6,99	14,7	49	70,1	30,0	12700	6604	0	5334	635	127	340000	6,0
16	7,34	14,8	48	65,4	30,8	10600	6784	0	2862	848	106	348000	7,4
17	7,05	14,3	48	68,1	29,8	12600	7812	0	3276	1008	504	490000	7,6
18	7,57	17,4	52	68,7	33,5	9400	5264	0	2726	1128	282	440000	7,4
19	1,22	4,1	12	98,4	34,2	30200	27180	302	2416	0	302	520000	5,6
20	2,32	4,8	22	94,8	21,8	6000	4140	120	1320	300	120	Agregados	7,0
21	2,90	6,1	18	62,1	33,9	6300	3843	63	2016	315	63	Agregados	5,2
22	2,20	5,1	17	76,0	30,0	33700	28645	2359	1685	0	1011	180000	5,2
23	10,10	14,2	46	45,5	30,9	18900	12663	378	3402	1890	567	440000	8,0
24	7,87	16,3	51	64,8	32,0	11100	4884	0	4773	888	555	304000	7,2
25	6,68	14,5	45	67,4	32,2	10800	6048	108	3672	648	324	396000	7,2
26	7,70	15,7	50	64,9	31,4	22400	14336	224	2240	4928	672	475000	8,4
27	5,42	10,5	34	62,7	30,9	22500	12375	225	9000	225	675	Agregados	8,6
28	7,25	16,5	51	70,3	32,4	13700	9864	274	1507	1918	137	700000	8,0
29	7,28	15,2	49	67,3	31,0	18000	16200	0	720	540	540	304000	8,6
30	6,71	12,4	42	62,6	29,5	12600	6804	0	4536	504	756	350000	8,0
31	6,95	13,2	42	60,4	31,4	19100	6303	0	12224	0	573	202000	9,8
32	6,30	12,6	38	60,3	33,2	8350	5428	84	2505	334	0	596000	7,8
33	5,06	9,3	30	59,3	31,0	10100	4848	0	2929	2020	303	290000	8,6
34	4,93	10,0	32	64,9	31,3	22300	12934	446	5352	2676	892	530000	8,0
35	6,40	12,8	38	59,4	33,7	26600	18354	0	4256	3192	798	540000	10,0
36	7,68	15,6	48	62,5	32,5	8200	4838	0	2788	246	328	255000	8,0
37	6,65	15,6	44	66,2	35,5	12000	8160	0	3120	720	0	515000	9,0
38	6,66	14,7	44	66,1	33,4	20100	13266	0	2211	4422	201	340000	8,2
39	6,20	13,3	43	69,4	30,9	11100	7659	0	2109	1110	222	430000	8,0
40	7,40	15,1	48	64,9	31,5	12700	6858	0	3302	2032	508	475000	8,6
41	6,11	11,0	36	58,9	30,6	23500	16450	235	2115	4230	470	Agregados	8,6
42	4,80	9,8	34	70,8	28,8	11500	5980	115	3105	2185	115	600000	7,0
43	7,16	14,5	41	57,3	35,4	10300	6180	103	2678	1133	206	530000	7,6
44	3,32	6,5	21	63,3	31,0	6900	4830	345	1380	207	138	115000	6,8
45	6,59	15,1	46	69,8	32,8	8400	5544	168	1260	924	504	600000	7,8
46	8,09	16,1	53	65,5	30,4	14300	9867	143	1001	2431	858	275000	9,0
47	8,80	17,0	54	61,4	31,5	10100	6262	101	2626	808	303	255000	8,6
48	6,43	11,4	38	59,1	30,0	14700	5733	147	1323	7056	441	245000	8,0
49	6,82	12,3	41	60,1	30,0	11000	3190	0	5390	2200	220	225000	8,0
50	6,58	12,8	44	66,9	29,1	9500	4655	190	3515	1045	95	265000	10,0
51	7,16	14,9	49	68,4	30,4	12800	7040	128	3712	1152	768	500000	10,0
52	8,12	16,4	53	65,3	30,9	12000	6480	240	3120	1680	480	665000	8,6
53	7,14	15,1	43	60,2	35,1	7500	4500	150	1800	900	150	405000	8,0
54	5,05	9,0	33	65,3	27,3	18200	11102	546	2548	2548	1456	665000	7,0
55	5,78	11,0	39	67,5	28,2	26900	19637	0	2959	3497	807	700000	8,0
56	6,09	12,6	39	64,0	32,3	12900	5934	129	4515	2064	258	510000	7,8

Erit.: eritrócitos; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; Leuc.: leucócitos; Neut.: neutrófilos; Seg.: segmentados; Bast.: bastonetes; Linf.: linfócitos; Eos.: eosinófilos; Mon.: monócitos; PPT: proteína plasmática total;

6.5 HEMOGRAMA E URINÁLISE CÃO 22



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
HOSPITAL VETERINÁRIO

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Exame:	FC:	Data:	09/11/2015
Nome: Cão 22	Espécie: Canina	Raça:	SRD
Sexo: M	Idade: 9 anos	Proprietário:	
Médico Veterinário(a):		Clínica Pequenos Animais	

HEMOGRAMA

ERITROGRAMA	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
ERITRÓCITOS(milhões/uL)	2,2	5,5 a 8,5
HEMATOCRITO (%)	17%	37 a 55
HEMOGLOBINA (g/dL)	5,1	12 a 18
VGM (u3)	76	60 a 77
CHGM (%)	30	32 a 36
Anisocitose:	discreta	
Policromatófilos (/campo):		
Metarrubrócitos (/100 leucócitos):	-	

Observações: presença de piroplasmas intraeritrocitários e livres no plasma.

LEUCOGRAMA	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
LEUCÓCITOS TOTAIS (uL)	33.700	6.000 a 17.000
	% Valor absoluto	% Valor absoluto
SEGMENTADOS	85 28.645	60 a 77 3.000 a 11.500
BASTONETES	7 2.359	0 a 3 0 a 300
METAMIELOCITOS	0 0	0 0
LINFÓCITOS	5 1.685	12 a 30 1.000 a 4.800
EOSINÓFILOS	0 0	2 a 10 100 a 1.250
MONOCITOS	3 1.011	3 a 10 150 a 1.350
BASÓFILOS	0 0	Raros Raros
Neutrófilos tóxicos:	raros, com basofilia citoplasmática	

Observações:

Proteína Plasmática Total (g/dL):	5,2	Referência: 6,0-8,0
Estimativa de plaquetas (uL):	180.000	Normal: 200.000 a 500.000

Prof^ª Rosângela Locatelli Dittrich Bianca Ressetti da Silva
CRMV 2241 PR CRMV 10.649 PR

Obs.: O(s) resultado(s) acima corresponde(m) apenas a(s) amostra(s) enviada(s) a este laboratório.
Rua dos Funcionários, 1540 - CEP: 80035-050 - Fone: (41) 3350-5740 - FAX (41) 3350-5623
Curitiba / Paraná - EMAIL: depvet@ufpr.br



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
HOSPITAL VETERINÁRIO**

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Exame:	Ficha Clínica:	Entrada: 09/11/2015
Nome: Cão 22	Espécie: Canina	Raça: SRD
Sexo: M	Idade: 9 anos	Proprietário:
Médico Veterinário (a):		Clínica de Pequeno Animais

URINÁLISE

1. EXAME FÍSICO

	Resultado	Valor de Referência
Coleta:	Sondagem	--
Volume (mL):	5,0	--
Cor:	Castanho	Amarelo
Aspecto:	Turvo	Límpido
Densidade:	1,038	1,034 - 1,060

2. EXAME QUÍMICO

	Resultado	Valor de Referência
pH:	5,5	5,5 - 7,5
Proteína (mg/dL):	2+ (100)	Negativo
Sangue (eri/ μ L):	3+ (300)	Negativo
Glicose (mg/dL):	Normal	Normal
Bilirrubina:	3+	Negativo
Urobilinogênio:	Normal	Normal
Corpos Cetônicos:	Negativo	Negativo
Nitrito:	Negativo	Negativo

3. SEDIMENTO

	Resultado	Valor de Referência	
		Cistocentese	Sondagem
Bactérias:	Raras a 1+	Ausentes	Raras
Leucócitos:	Raros	0 a 3/campo	0 a 5/campo
Hemácias:	4 a 6 /campo	Raras	Raras
Céls. ep. pavimentosas T.U.I.:	Ausente	Raras	Raras
Céls. ep. de transição:	Raras	Raras	Raras
Céls. ep. renais:	Raras	Ausentes	Ausentes
Céls. ep. caudadas da pelve:	Ausente	Ausentes	Ausentes
Cilindros hialinos:	Ausente	Raros	Raros
Cilindros granuloso:	2 a 3 /campo	Ausentes	Ausentes
Cilindros céreos:	Ausente	Ausentes	Ausentes
Cristais de oxalato de cálcio:	Ausente	Ausentes	Ausentes
Cristais de carbonato de cálcio:	Ausente	Ausentes	Ausentes
Cristais de bilirrubina:	Raros	Ausentes	Ausentes
Cristais de estruvita:	Ausente	Ausentes	Ausentes
Impregnação por bilirrubina:	2+	Ocasional	Ocasional
Góticulas de gordura:	Raras	Raras	Raras
Espermatozóides:	2+	Ausentes	Ocasional

Obs:

4. RELAÇÃO PROTEÍNA: CREATININA URINÁRIA (RPC)

RPC	Não solicitado	Normal:	$\leq 0,2$
		Incerto:	0,2 - 0,5
		Patológico:	$\geq 0,5$

Prof^a Rosângela Locatelli Dittrich Bianca Ressetti da Silva
CRMV 2241 PR CRMV 10.649 PR

Obs.: O(s) resultado(s) acima corresponde(m) apenas a(s) amostra(s) enviada(s) a este laboratório.
Rua dos Funcionários, 1540 - CEP: 80035-050 - Fone: (41) 3350-5740 - FAX (41) 3350-5623
Curitiba / Paraná - EMAIL: depvet@ufpr.br

6.6 HEMOGRAMA CÃO 27



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
HOSPITAL VETERINÁRIO

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Exame:	FC:	Data:	30/11/2015
Nome: Cão 27	Espécie: Canina	Raça:	SRD
Sexo: M	Idade:	Proprietário:	
Médico Veterinário(a):		Clínica Pequenos Animais	

HEMOGRAMA

ERITROGRAMA	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
ERITRÓCITOS (milhões/uL)	5,4	5,5 a 8,5
HEMATÓCRITO (%)	34%	37 a 55
HEMOGLOBINA (g/dL)	10,5	12 a 18
VGM (u3)	63	60 a 77
CHGM (%)	31	32 a 36
Anisocitose:	moderada	
Policromatófilos (/campo):	2	
Metarrubrócitos (/100 leucócitos):	-	

Observações: Presença de Corpúsculos de Howell Jolly.

LEUCOGRAMA	RESULTADOS		VALORES DE REFERÊNCIA	
LEUCÓCITOS TOTAIS (u/L)	22.500		6.000 a 17.000	
	%	Valor absoluto	%	Valor absoluto
SEGMENTADOS	55	12.375	60 a 77	3.000 a 11.500
BASTONETES	1	225	0 a 3	0 a 300
METAMIELOCITOS	0	0	0	0
LINFÓCITOS	40	9.000	12 a 30	1.000 a 4.800
EOSINÓFILOS	1	225	2 a 10	100 a 1.250
MONÓCITOS	3	675	3 a 10	150 a 1.350
BASÓFILOS	0	0	Raros	Raros
Neutrófilos tóxicos:				

Observações: **agregação plaquetária;

Proteína Plasmática Total (g/dL):	8,6	Referência: 6,0-8,0
Estimativa de plaquetas (uL):	**	Normal: 200.000 a 500.000

Profª Rosângela Locatelli Dittrich Bianca Ressetti da Silva
CRMV 2241 PR CRMV 10.649 PR

Obs.: O(s) resultado(s) acima corresponde(m) apenas a(s) amostra(s) enviada(s) a este laboratório.
Rua dos Funcionários, 1540 - CEP: 80035-050 - Fone: (41) 3350-5740 - FAX (41) 3350-5623
Curitiba / Paraná - EMAIL: depvet@ufpr.br

6.7 HEMOGRAMA DO CÃO 48



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
HOSPITAL VETERINÁRIO

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA

Exame:	FC:	Data:	12/02/2016
Nome: Cão 48	Espécie: Canina	Raça:	Lhasa Apso
Sexo: M	Idade: 4 anos	Proprietário:	
Médico Veterinário(a):		Clínica Pequenos Animais	

HEMOGRAMA

ERITROGRAMA	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
ERITRÓCITOS (milhões/uL)	6,4	5,5 a 8,5
HEMATÓCRITO (%)	38%	37 a 55
HEMOGLOBINA (g/dL)	11,4	12 a 18
VGM (u3)	59	60 a 77
CHGM (%)	30	32 a 36
Anisocitose:	-	
Policromatófilos (/campo):	-	
Metarrubrócitos (/100 leucócitos):	-	

Observações:

LEUCOGRAMA	RESULTADOS		VALORES DE REFERÊNCIA	
LEUCÓCITOS TOTAIS (u/L)	14.700		6.000 a 17.000	
	%	Valor absoluto	%	Valor absoluto
SEGMENTADOS	39	5.733	60 a 77	3.000 a 11.500
BASTONETES	1	147	0 a 3	0 a 300
METAMIELÓCITOS	0	0	0	0
LINFÓCITOS	9	1.323	12 a 30	1.000 a 4.800
EOSINÓFILOS	48	7.056	2 a 10	100 a 1.250
MONÓCITOS	3	441	3 a 10	150 a 1.350
BASÓFILOS	0	0	Raros	Raros
Neutrófilos tóxicos:				

Observações:

Proteína Plasmática Total (g/dL):	8,0	Referência: 6,0-8,0
Estimativa de plaquetas (uL):	245.000	Normal: 200.000 a 500.000

Profª Rosângela Locatelli Dittrich Bianca Ressetti da Silva
CRMV 2241 PR CRMV 10.649 PR

Obs.: O(s) resultado(s) acima corresponde(m) apenas a(s) amostra(s) enviada(s) a este laboratório.
Rua dos Funcionários, 1540 - CEP: 80035-050 - Fone: (41) 3350-5740 - FAX (41) 3350-5623
Curitiba / Paraná - EMAIL: depvet@ufpr.br

5.8 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA SEQUÊNCIA GENÉTICA DA *Rangelia vitalii* NO GENBANK



Bianca Ressetti da Silva <biaressetti@gmail.com>

GenBank MG027583-MG027585

1 mensagem

gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov <gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov>
Para: biaressetti@gmail.com, biaressetti@hotmail.com

3 de outubro de 2017 17:44

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your direct submission of sequence data to GenBank. We have provided GenBank accession number(s) for your nucleotide sequence(s):

SUB3104268 Seq1 MG027583
SUB3104268 Seq2 MG027584
SUB3104268 Seq3 MG027585

GenBank accession numbers should appear in any publication that reports or discusses the data, as it gives the community a unique label with which they may retrieve your data from our online servers.

Based on the data submitted to us, the scheduled release date for your submission is:

Oct 9, 2017

The entire sequence will be released when the article citing this accession number(s) is published or on the above release date, whichever comes first. If this date is not correct, please let us know as soon as possible, otherwise this submission will be released on the date indicated above. The data will become available from our different servers within a few days of release and are simultaneously made available to ENA in Europe and the DNA Data Bank of Japan.

A copy of your revised files can be viewed at

<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/?search=SUB3104268>

The accession number link in the Submission Portal will not be active until a few days after the public release of the sequences.

Minor changes may have been made to your original submission in order to conform to database annotation conventions. In particular, please review:

- Spelling
- Citation data (page span, etc.)
- Nomenclature ('official' gene names, product labels, etc.)