

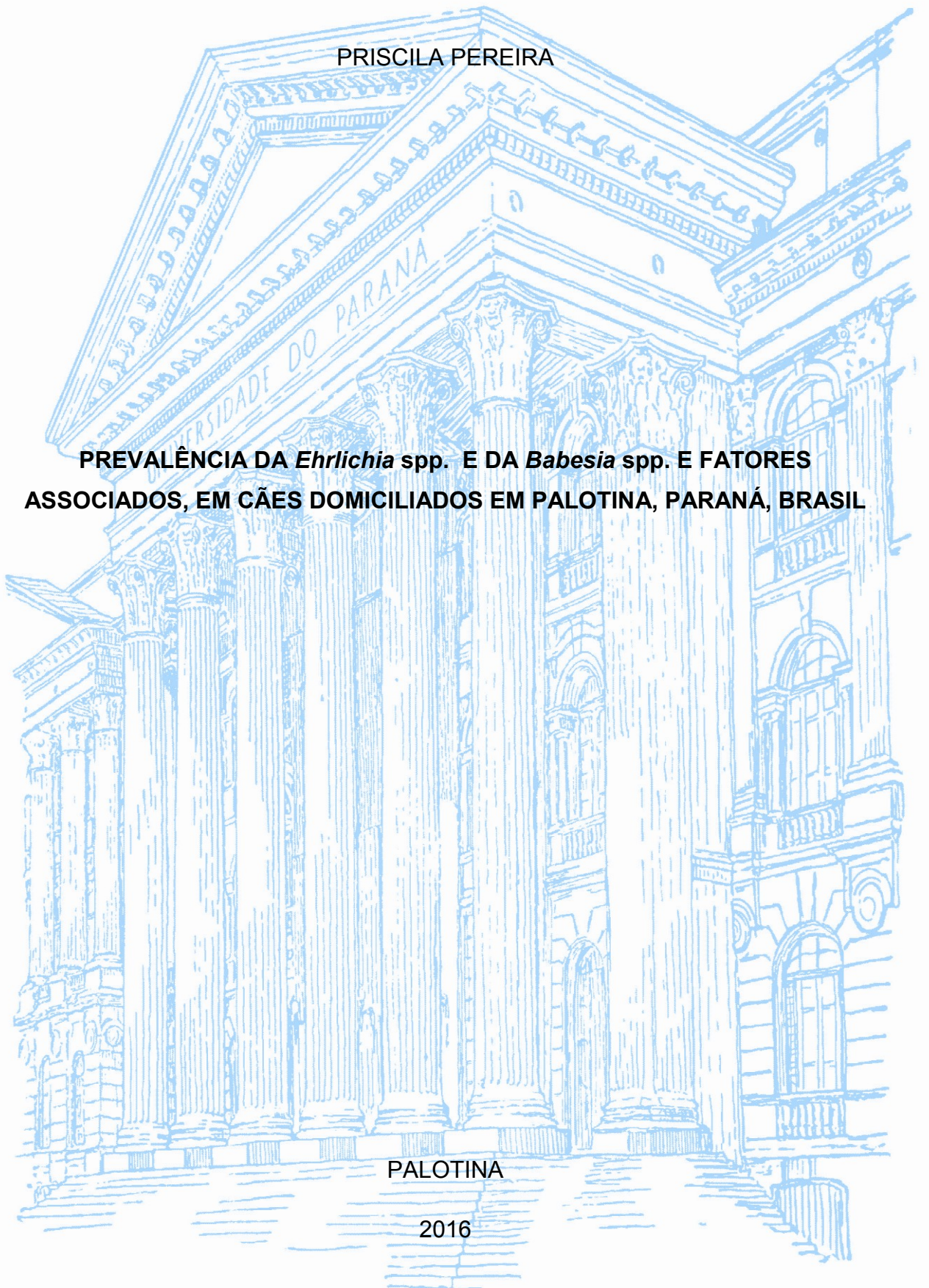
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA PEREIRA

PREVALÊNCIA DA *Ehrlichia* spp. E DA *Babesia* spp. E FATORES ASSOCIADOS, EM CÃES DOMICILIADOS EM PALOTINA, PARANÁ, BRASIL

PALOTINA

2016



PRISCILA PEREIRA

PREVALÊNCIA DA *Ehrlichia* spp. E DA *Babesia* spp. E FATORES ASSOCIADOS, EM CÃES DOMICILIADOS EM PALOTINA, PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia aplicada à Produção Animal, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki

PALOTINA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P436 Pereira, Priscila
Prevalência da *ehrlichia* spp. e da *babesia* spp.
e fatores associados, em cães domiciliados em Palotina,
Paraná, Brasil / Priscila Pereira. - Palotina, 2016
65f.

Orientador: Silvia Cristina Osaki
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em
Ciência animal.

1. *Babesiosis* . 2. *Hemoparasites*. 3. *Ehrlichiosis*
I. Osaki, Silvia Cristina . II. Universidade Federal do
Paraná. III. Título.

CDU 636.8



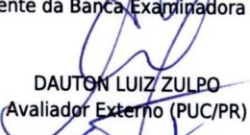
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P6

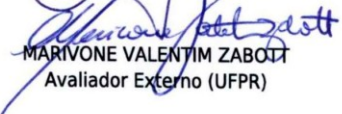
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **PRISCILA PEREIRA**, intitulada: "**PREVALÊNCIA DA *Ehrlichia* spp. E DA *Babesia* spp. E FATORES ASSOCIADOS, EM CÃES DOMICILIADOS EM PALOTINA, PARANÁ, BRASIL**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Palotina, 08 de Dezembro de 2016.


SILVIA CRISTINA OSAKI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


DAUTON LUIZ ZULPO
Avaliador Externo (PUC/PR)


MARIVONE VALENTIM ZABOTT
Avaliador Externo (UFPR)



Certificado

Certificamos que o **Protocolo nº 33/2015** referente ao projeto de pesquisa **Prevalência da erliquiose monocítica canina e babesiose canina e fatores de risco associados**, sob responsabilidade de **Prof. Dr. Sílvia Cristina Osaki**, está de acordo com os Princípios Éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em **29/09/2015**.

O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:


- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras

Palotina, 22 de outubro de 2015.

Certificate

*Certify that the **Protocol n. 33/2015** regarding the research project **Prevalence monocytic ehrlichiosis canine and babesiosis canine and associated risk factors**, under responsibility of **Prof. Dr. Sílvia Cristina Osaki**, is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the Brazilian Council on the Control of Animal Experiments (CONCEA) and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in September 29, 2015.*

Palotina, October 22, 2015.


Prof.ª Dr.ª Erica Cristina B. P. Guirro
Coordenadora/Coordinator
CEUA/Palotina - UFPR

Prof.ª Dr.ª Erica C. B. P. Guirro
CRMV-PR 7403 - SIAD 190462
UFPR - Setor Palotina

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Priscila Pereira, filha de Gilsomar Vicente Pereira e Ieda Maria Leal da Cruz, nascida aos 18 dias do mês de abril do ano de 1989, em Curitiba, Paraná, Formada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina no ano de 2012. Conclusão da Residência Clínica Médica de Pequenos Animais, pelo Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, no ano de 2015. Mestranda do programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

“Peça a Deus que Ele abençoe os seus planos, e eles darão certo”.

(Provérbios 16:3)

Dedico este trabalho à minha mãe, pelos esforços imensuráveis para que pudesse me formar e conquistar cada um dos meus objetivos. Obrigada por tudo. Eu amo você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado forças para lutar por essa conquista e por sempre estar presente em minha vida. Senhor, eu sou eternamente grata a Ti, por tudo o que eu tenho e tudo o que eu sou.

À minha família por toda a ajuda, todo o carinho e por sempre estarem presentes na minha vida nesses longos nove anos em Palotina. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui. Agradeço especialmente à minha mãe, Ieda Maria Leal da Cruz e ao meu marido, Cleverson Wiggers dos Santos, por nunca terem desistido de mim e dos meus sonhos. Sem o apoio, a dedicação, a paciência, os conselhos e os “empurrões” de vocês, esse mestrado não teria acontecido. Família, eu amo vocês!

Aos amigos que fiz nessa jornada e aqueles que já faziam parte dessa trajetória acadêmica, saibam que sempre estaram em meu coração, e que o que Palotina uniu a distância não separa. Aos mestres o meu mais sincero muito obrigada, se hoje esse sonho está se tornando realidade, é graças aos ensinamentos que me passaram.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Silvia Cristina Osaki, pela paciência mediante as limitações dos meus entendimentos e pela oportunidade de transformações de novos conhecimentos.

Agradeço a todos que estiveram envolvidos com esse projeto, desde o planejamento, coletas, processamento de amostras e realização dos exames. A todos os estagiários do Labiotec, ao professor Dr. Daniel Moura de Aguiar, a Isis I.G.G.Taques e ao professor Dr. Dauton Luiz Zulpo, o meu muito obrigada!

Por fim, agradeço aos animais, que são a razão da minha profissão e a paixão da minha vida. Aos meus paciente, obrigada por cada lambida, cada abano de rabo, cada ronronado, cada arranhão e mordida. Aos meus filhos peludos, Kiara Letícia, Magoo Francisco, Dorothi Carolina e Dobby Luiz, vocês são a alegria da minha da minha vida.

RESUMO

As doenças transmitidas por artrópodes induzem várias enfermidades, destacando-se a Erliquiose Monocítica Canina (EMC) e a Babesiose Canina, transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A EMC é causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, enquanto a Babesiose Canina é causada pelo protozoário *Babesia* spp. . O diagnóstico pode ser realizado por esfregaço de sangue periférico, buscando o agente etiológico, por meio de sorologia, para a identificação de anticorpos anti – *E. canis* e anti – *B.canis* e pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) detectando o DNA do agente etiológico. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a soroprevalência da EMC e da Babesiose Canina no município de Palotina – Paraná, detectar a presença dos agentes no sangue dos animais e identificar os fatores de riscos para cada doença. A soroprevalência da EMC foi determinada pelo exame de Imunofluorescência Indireta e o Ensaio Imunoenzimático Indireto foi realizado para demonstrar a soroprevalência da Babesiose Canina. Para ambas as doenças foi realizado o esfregaço de sangue periférico e exame de PCR para identificação do DNA do agente etiológico. Os fatores de risco foram avaliados por meio de um questionário epidemiológico. A prevalência observada para EMC e Babesiose canina são 25,73% e 7,4% respectivamente. No exame de PCR para *Ehrlichia* spp e *Babesia canis*, foram identificadas 8,96% e 1,68% de positividade, respectivamente. Os fatores de risco para EMC estão relacionadas com o manejo do animal, modo de criação e presença de carrapatos. Para Babesiose Canina, os fatores de riscos estão relacionados com o grau de escolaridade dos tutores, manejo do animal e modo de criação.

Palavras chave: Hemoparasitas, PCR, babesiose, erliquiose, sorologia, esfregaço sanguíneo

ABSTRACT

PREVALENCE OF *Ehrlichia* spp. AND DA *Babesia* spp. AND ASSOCIATED FACTORS, IN DOGS DOMICILATED IN PALOTINA, PARANÁ, BRAZIL

Arthropod-borne diseases induce several disorders, such as Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) and Canine Babesiosis, transmitted by the *Rhipicephalus sanguineus* tick. The CME is caused by the bacteria *Ehrlichia canis*, while the Canine Babesiosis is caused by the protozoan *Babesia* spp. The diagnosis can be performed by peripheral blood smear, seeking the etiological agent, by means of serology, for the identification of anti-E antibodies *Canis* and anti-B *canis* and by the polymerase chain reaction (PCR) technique which detects the DNA of the etiologic agent. The objective of this study was to demonstrate the seroprevalence of CME and Canine Babesiosis in Palotina (PR) town and to identify the risk factors for each disease. The CME seroprevalence was performed by the Indirect Immunofluorescence test and the Indirect Immunoenzyme Assay was performed to demonstrate the seroprevalence of Canine Babesiosis. For both diseases, peripheral blood smear and PCR were performed to identify the DNA of the etiological agent. Risk factors were assessed using an epidemiological questionnaire. The prevalence observed for CME and Canine Babesiosis is 25.73% and 7.4%, respectively. In the PCR test for *Ehrlichia* spp. and *Babesia canis*, 8.96% and 1.68% of positivity were identified, respectively. The risk factors for CME are related to the management of the animal, raise mode and presence of ticks. For Canine Babesiosis, the risk factors are related to the level of scolarity of the tutor, animal management and raise mode.

Keywords: Hemoparasites, PCR, babesiosis, ehrlichiosis, serology, blood smear

LISTA DE ABREVIATURAS

%	-Porcentagem
°C	-Grau Celsius
BID	-Bis in die, duas vezes ao dia
DNA	-Ácido desoxirribonucleico
EDTA	-Etilenodiamino tetra acético
ELISA	-Ensaio imunoenzimático indireto
HOVET	-Hospital Veterinário
Kg	-Quilograma
Km	-Quilometro
Labiotec	-Laboratório de Biotecnologia
Mg	-Miligrama
MgCl	-Cloreto de Magnésio
nM	-Nanômetro
PCR	-Reação de polimerase em cadeia
RIFI	-Reação de imunofluorescência indireta
pH	-Potencial Hidrogênio Iônico
SID	-Semel in die, uma vez ao dia
UFMT	-Universidade Federal do Mato Grosso
µL	-Microlitro

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Exames realizados para a identificação da presença de *Ehrlichia spp.*, em amostras de cães assintomáticos da cidade de Palotina-Paraná. .44
- Tabela 2-** Fatores de riscos associados a Erliquiose Monocítica Canina no município de Palotina-Paraná, Brasil.46
- Tabela 3-** Exames realizados para a identificação da presença de *Babesia spp.*, em amostras de cães assintomáticos da cidade de Palotina-Paraná. .48
- Tabela 4-** Fatores de riscos associados a Babesiose Canina no município de Palotina-Paraná, Brasil.....49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos de amplificação de fragmento gênico por PCR. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (409pb). Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular; 2: Controle positivo; 3, 5, 6 e 9: Amostras de campo positivas; 4, 7 e 8: Amostras de campo negativas; 10: Controle negativo.....38
- Figura 2-** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos de amplificação de fragmento gênico por PCR. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (541pb). Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular; 2: Controle positivo; 3 a 9: Amostras de campo negativas; 10: Controle negativo.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA	19
2.2 BABESIOSE CANINA	26
3 OBJETIVO	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	34
4.2 AMOSTRAGEM	34
4.3 ESFREGAÇO SANGUÍNEO	35
4.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA) PARA <i>Babesia canis</i>	35
4.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA <i>Ehrlichia</i> spp. .	36
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	36
4.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA <i>Ehrlichia</i> spp.	37
4.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA <i>Babesia</i> spp.	38
4.0 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA	41
5.2 BABESIOSE CANINA	46
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS	52
ANEXO 1	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças transmitidas por artrópodes são mundialmente ressaltadas como de importância à saúde humana e animal. Numerosos agentes infecciosos em diferentes hospedeiros induzem enfermidades diversas (HARRUS e BANETH, 2006). Dentre as doenças emergentes transmitidas por artrópodes em cães, destacam-se infecções por agentes do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos, a *Ehrlichia* e a *Babesia* transmitidos por carrapatos (SALGADO, 2006), sendo que essas enfermidades acometem animais domésticos, silvestres e o homem (BOOZER e MACINTIRE, 2003).

Os carrapatos são vetores de enfermidades de importância à saúde humana e animal. Características como a capacidade de sobreviver em ambientes diversificados e ficar sem se alimentar por longos períodos, além de uma ampla distribuição geográfica, faz desse ectoparasita um dos mais importantes em termo de transmissão de doenças. O carrapato vermelho do cão *Rhipicephalus sanguineus*, espécie mais difundida no mundo é um importante vetor de patógenos caninos como *Babesia* spp. *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsii* (DANTAS-TORRES, 2008).

A erliquiose e a babesiose são consideradas as hemoparasitoses mais comuns nos cães, as quais influenciam e comprometem a saúde do animal (GREENE, 2006). A erliquiose é causada por um grupo de bactérias gram negativas intracelulares obrigatórias, os quais parasitam células brancas de várias espécies de animais domésticos e silvestres, incluindo o homem. As espécies que parasitam os cães são *E. equi*, *E. platy*, *E. ewing*, *E. chaffensis* e *E. canis*. A EMC é uma doença relativamente frequente em cães, sendo considerada uma das mais importantes doenças que acometem esses animais (BORIN et al., 2009).

A babesiose é uma infecção causada por protozoários, são parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Babesia* (HOMER et al., 2000). A babesiose ou piroplasmose é uma hemoparasitose de importante significado clínico e está associada à presença de carrapatos. A doença tem uma distribuição mundial, sendo descrita em animais domésticos e silvestres (SCHNITTGER et al., 2012). Atualmente são conhecidas mais de 100 espécies de *Babesia* (CHAUVIN et

al.,2009), mas somente a *B. canis*, *B. gibsoni* e *B. conradae* têm sido relacionadas por infectar cães (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006).

A transmissão de *Babesia canis* e *E.canis* está relacionada à alta incidência do vetor e vem demonstrando uma crescente prevalência de infestações por carrapatos nos cães (LABRUNA, 2004). As infecções pela *E. canis* foram relatadas em cães com infecção concomitante com a *B. canis*, o que sugere transmissão simultânea de microrganismos oriundos dos carrapatos (BREITSCHWERT,2004). A importância, tanto econômica quanto de saúde pública, das doenças veiculadas por artrópodes tem impulsionado o diagnóstico dessas enfermidades no hospedeiro animal e nos vetores (HARRUS et al., 2010). No Brasil, as doenças vinculadas por artrópodes têm sido amplamente estudadas nas populações, entretanto, poucos estudos são realizados focando na infecção dos carrapatos (ALMEIDA et al., 2012), e pouco se sabe sobre os possíveis fatores de risco dessas doenças (DANTAS-TORRES e FIGUEREDO, 2006).

A EMC pode ser diagnosticada através da detecção direta de mórulas intracitoplasmáticas em esfregaço de sangue periférico ou concentrado leucocitário, durante a fase aguda (NAKAGHI et al., 2010). A imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) detectam a presença de imunoglobulinas IgG contra *E. canis* e *B. canis* no soro, sendo um método muito sensível, mas pode apresentar reação cruzada com outras rickettsias (ALVES et al., 2004). Esses testes são utilizados como forma de triagem e não de diagnóstico, pois os resultados negativos não excluem totalmente a suspeita de erliquiose e babesiose, pois a doença clínica pode ser detectada antes da soroconversão (NELSON e COUTO, 2010).

A PCR é o teste específico mais sensível para *Ehrlichia* (VIEIRA et al., 2011). Este teste possui a vantagem de detectar o DNA do agente etiológico nos primeiros dias pós- infecção, sendo bastante específico. A amplificação do DNA de *Ehrlichia* spp. a partir de amostras clínicas é importante para a detecção e diferenciação das espécies de *Ehrlichia* (SOUSA et al. 2010).

As técnicas diagnósticas ainda são limitadas, tendo em vista que exigem mão de obra especializada e equipamentos laboratoriais onerosos. Desse modo, alguns médicos veterinários recorrem apenas a exames hematológicos e bioquímicos para dar suporte a suspeita clínica, apesar das alterações detectadas por estes exames

não serem patognomônicas dessas doenças (OTRANTO,2009). Este comportamento pode levar a diagnósticos etiológicos incorretos e prescrições terapêuticas ineficazes (DE CAPRARIIS, 2011).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA

Diversas doenças transmitidas por carrapatos têm assumido importância tanto em saúde pública, quanto animal. Entre elas, a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), causada pela *Ehrlichia canis* e transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, tem sido descrita no Brasil desde 1973 e atualmente a erliquiose encontra-se disseminada em vários estados brasileiros (MACEDO e LEAL, 2005), apresentando alta morbidade e variada mortalidade em regiões de clima quente (BARR e BOWMAN,2010).

A EMC no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada por muitos como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais, principalmente pela elevada e disseminada infestação por carrapatos, pela inexistência de vacina, pela inexistência de imunidade adquirida eficiente, pela complexidade e em algumas vezes pela ineficiência do protocolo terapêutico (MACHADO, 2004; AGUIAR, 2007).

A Erliquiose canina é uma doença causada por uma riquetsia pertencente ao gênero *Ehrlichia*, Família Rickettsiaceae, Ordem Rickettsiales, Gênero *Ehrlichia* spp, Espécie *Ehrlichia canis*, que são bactérias gram negativas, com forma de cocobacilos e multiplicam-se por divisão binária (NEER e HARRUS, 2006). Esses micro-organismo são parasitas intracelular obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema mononuclear, tais como monócitos e macrófagos, e para algumas espécies em células mielóides, tais como neutrófilos (MENDONÇA et al., 2005; AGUIAR et al., 2007).

As espécies que naturalmente infectam os cães incluem *E. canis*, *E. equi*, *E. risticii*, *E. platys* e *E. ewingii* (NELSON e COUTO, 2010). A *E. canis* é a causa mais comum de infecção natural em cães e é considerada a mais severa (BORIN et al., 2009). No Brasil, três espécies foram descritas, *E.ewingii*, agente etiológico da erliquiose granulocítica humana e canina, a *E.chaffensis*, a gente da erliquiose monocítica humana (OLIVEIRA et al., 2009), e a *E. canis* sendo a única espécie descrita, até o momento no Brasil, como agente etiológico da erliquiose canina monocítica (EMC) (SOUSA, 2012).

O carrapato se infecta ao ingerir leucócitos circulantes contendo o agente, que estavam presentes no sangue do cão na fase aguda da doença (NELSON e COUTO,2010). No carrapato, *R.sanguineus*, ocorre a transmissão transestadial de *E. canis*, mas não transovariana (DUMLER et al, 2001), dessa forma, os carrapatos livres de contaminação devem realizar o repasto sanguíneo em um cão que esteja na fase aguda da doença para se contaminar (NELSON e COUTO,2010). Os três estágios do ciclo de vida do vetor, larva, ninfa e adulto, podem transmitir a doença (ALMOSNY,2002).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando o carrapato, *Rhipicephalus sanguineus*, Durante a ingestão do sangue, inocula junto com a saliva os micro-organismos (AGUIAR et al., 2007). O carrapato encontra-se provavelmente em todo o território nacional, preferencialmente em áreas urbanas do país e em menor densidade nas regiões rurais (LABRUNA e PEREIRA,2001). Após se infectar, o carrapato pode transmitir a *E.canis* por até cinco meses (DANTAS-TORRES,2008). A infecção também pode ser introduzida em cães susceptíveis por transfusão sanguínea (TILLEY, SMITCH e FRANCIS 2003).

A erliquiose pode acometer cães com idades variadas e já foi relatada em animais entre dois meses e treze anos de idade (BORING et al., 2009). A severidade da doença vai depender da susceptibilidade racial, idade do animal, alimentação, doenças concomitantes e da virulência da cepa infectante (SILVA, 2010). As manifestações clínicas são inespecíficas (WANER, STRENGER e KESARY, 2000), porém os sinais comuns em erliquiose são a apatia, inapetência, hipertermia, mucosas pálidas e hemorragia, linfadenopatia, esplenomegalia e uveítes (NAKAGUI et al., 2008).

A proliferação de *E. canis* no hospedeiro se inicia com a aderência à membrana citoplasmática da célula e invaginamento da mesma. Após penetrar na célula do hospedeira se localiza no interior do vacúolo onde se multiplica por divisão binária, formando as inclusões intracelulares denominada mórulas (STICH et al, 2008).

Após um período de incubação de sete a 20 dias, a doença pode se manifestar de três formas: aguda, subclínica e crônica (BICHARD e SHERDING,2008). Em infecções experimentais, é possível diferenciar as três fases, mas em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez

que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares, bem como a duração e a severidade dos sinais clínicos é variável (SANTAREM, 2003).

As manifestações clínicas podem ser afetadas pela virulência de cepas diferentes de *E.canis* e a co-infecção de outros patógenos transmitidos por carrapatos, como a *Babesia canis vogeli* e o *Hepatozoon canis* (GAL et al., 2007). A co- infecção por mais de uma espécie erliquial ou com outros hemoparasitas é comum (RAMOS et al., 2009). Os cães infectados com *E.canis* apresentam alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas bastante inespecíficas e o diagnóstico presuntivo pode ser firmado com base nos sinais clínicos e nos exames laboratoriais. Porém, o diagnóstico definitivo depende da visualização de mórulas , da determinação de altos títulos de anticorpos anti- *E. canis* e/ou a detecção de DNA de *E.canis* pela PCR (SOUSA et al., 2011).

A fase aguda se prolonga de duas a quatro semanas, quando o micro-organismo se multiplica na corrente sanguínea e nos tecidos fagocitários do fígado, baço e linfonodo (ETTINGER e FELDMAN, 2010), resultando em hiperplasia dessa linhagem celular e organomegalia do fígado, baço e linfonodos (BICHARD; SHERDING, 2008). Nesta fase o animal pode apresentar anorexia, perda de peso, edema de membros, vômito, cianose, estertores pulmonares, petéquias (ALMOSNY,2002) e trombocitopenia, que é considerada a alteração hematológica mais comum em paciente com EMC (HARRUS, WANER e NEER, 2012).

A fase subclínica é caracterizada pela persistência da *E. canis* no animal (MENDONÇA et al., 2005). Esta fase ocorre de seis a nove semanas após a inoculação, mas pode durar meses ou anos. É caracterizada por persistência de trombocitopenia, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos (SOUSA et al., 2010). Alguns animais podem apresentar depressão, perda de peso, mucosa hipocorada e hemorragias. Ao final da fase subclínica, instala-se a fase crônica devido à ineficiência do sistema imune do animal (LEGATZKI,2002).

A fase crônica ocorre em cães que não conseguem construir uma efetiva resposta imune ao micro-organismo (BICHARD e SHERDING, 2008). Geralmente as infecções crônicas não são reconhecida, pois os cães parecem saudáveis até o surgimento dos sinais clínicos (GREENE,2006). Esta fase é caracterizada por pancitopenia devido à hipoplasia e supressão de medula óssea (HARRUS, WANER e NEER, 2012). Frequentemente a trombocitopenia grave pode causar epistaxe,

petéquias ou equimoses hemorrágicas, melena e hematúria, hifema, hemorragia de retina e uveíte anterior (NEER e HARRUS, 2008).

O diagnóstico é feito por meio de sinais clínicos, associado com sorologia, resultados laboratoriais, achados citológicos, sendo mais recentemente a reação em cadeia da polimerase (PCR) incorporada ao plano diagnóstico (NERR e HARRUS, 2006). A PCR é amplamente empregada na pesquisa, mas na rotina clínica o diagnóstico ainda baseia-se nos exames laboratoriais (RAMOS, 2009), onde os médicos veterinários levam em consideração o valor da contagem de plaquetas, pois um dos principais sinais da erliquiose é a trombocitopenia (MENDONÇA et al., 2005), na detecção de estruturas morfológicamente compatíveis com *E. canis* em células mononucleares e plaquetas advindas do sangue periférico no esfregaço sanguíneo e no exame clínico, apesar de resultar no grande número de falsos negativos (RAMOS, 2009)

O diagnóstico de EMC pode ser dado através da presença de mórulas nos leucócitos parasitados, encontrados na avaliação do esfregaço sanguíneo (GARCIA FILHO et al., 2010). Apesar da rapidez na execução e baixo custo, esta técnica nem sempre é eficaz para a detecção de mórulas, devido a constante flutuação da parasitemia durante o curso da doença (ALMOSNY, 2002; ALVES et al., 2004). A detecção de mórulas da *E. canis* é considerada um achado circunstancial, devido à sua infrequência (ORIÁ, 2001), porém a ausência de mórulas não exclui o diagnóstico positivo (NAKAGHI, 2010).

A imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos IgG anti- *E. canis* é considerado o método sorológico “padrão ouro”, indicando a exposição ao agente (HARRUS e WANER, 2011). É considerado um método sensível, mas pode apresentar reações cruzadas com outras riquetsias. Os títulos podem persistir por nove a 12 meses pós infecção (ALVES et al., 2004). Apesar de ser um teste sensível, não é possível distinguir infecção atual de infecção anterior (NAKAGHI, 2010).

A RIFI é atualmente o teste de escolha para o diagnóstico sorológico de infecção riquetsial em seres humanos e animais, sendo recomendada como padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (GALVÃO et al., 2005). Em geral, só é possível detectar anticorpos antiriquetsias após a segunda semana do início da doença. Para a confirmação diagnóstica é necessária uma elevação de quatro vezes

no título de anticorpos em amostras pareadas. Alternativamente, um título único maior que 1.024 também pode ser considerado indicativo de infecção (GASSER et al., 2001).

Uma limitação da RIFI é que pode ocorrer reação cruzada entre *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffinensis* e outras espécies de *Ehrlichia*, gerando resultados falso positivos. Além disso, na fase aguda, podem ocorrer resultados falso negativos quando os cães falham na produção de anticorpos ou encontram-se nos primeiros dias pós-infecção (CADERNAS et al., 2007).

A PCR é o teste específico mais sensível para *Ehrlichia* em comparação com os outros métodos diagnósticos (VIEIRA et al., 2011). A técnica permite um diagnóstico preciso, podendo ser usada para detectar o DNA específico do micro-organismo em leucócitos de sangue periférico (ALVES et al., 2004) e possui a vantagem de detectar o DNA do agente etiológico nos primeiros dias pós infecção (SOUSA et al., 2010).

A detecção de DNA de *E. canis* pode ser obtida cerca de quatro a 10 dias após a inoculação. A técnica pode ser realizada a partir de vários genes alvo (16 rRNA, p28, p30, dbp, VirB9), porém a PCR para os genes 16 rRNA e p30 são mais comumente usados (STICH, 2008), no entanto, uma análise comparativa entre a PCR (gene dbp) e a nested PCR (nPCR) (gene 16rRNA), realizada em 24 amostras de sangue de cães naturalmente infectados com *E. canis*, demonstrou que as duas técnicas são adequadas para o diagnóstico da EMC (MACHADO, 2004), sendo a nPCR a única técnica capaz de diferenciar a espécie de *Ehrlichia* spp. A PCR em etapa única tem como vantagem a redução do falso positivo e a diminuição do tempo de execução (ALVES et al., 2005).

O uso de amostras de sangue como material para a realização da PCR pode resultar em falso negativo, mesmo em animais na fase aguda da doença, visto que a parasitemia do agente normalmente é baixa. Na fase crônica, a detecção do material genômico é mais difícil (DAGNONE et al., 2009). De acordo com Harrus (2004), amostras obtidas por técnicas mais invasivas, como aspirado de baço, na fase crônica da doença, pode aumentar a sensibilidade da técnica de PCR, porém, não se apresentam como técnicas viáveis para a rotina médica.

O resultado negativo na PCR denota quando nenhum DNA alvo foi encontrado, mas não necessariamente prova que não havia nenhum DNA na amostra. Resultados falso-negativos podem acontecer quando usada temperatura de anelamento relativamente baixa ou quando ocorre uma amplificação inespecífica (STICH et al., 2008). Também pode ocorrer resultados falso positivo em decorrência da contaminação das amostras (CARMO e FIORINI,2009).

A primeira descrição de um cão infectado por *E. canis* ocorreu na Argélia em 1935 e foi reconhecida nos Estados Unidos da América em 1962 (LITTLE,2010) . Atualmente a distribuição da erliquiose é ampla (VIEIRA et al., 2011). A *E. canis* ocorre em muitos países de clima temperado, tropical e subtropical do mundo, coincidindo com a prevalência do seu vetor (ALMOSNY,2002).

Estudos citológicos, sorológicos e moleculares têm apresentado evidências de cães infectados por *E.canis* na África, Ásia, Europa e América do Norte, Central e do Sul (STICH et al., 2008). No Brasil, a erliquiose monocítica canina foi descrita pela primeira vez em Belo Horizonte, Minas Gerais (MACEDO e LEAL, 2005). Atualmente, aproximadamente 20-30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em várias cidades do Sudeste, Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, apresentam anticorpos contra antígenos de *E. canis* (MOREIRA et al., 2003).

Estudos epidemiológicos sobre a EMC vêm demonstrando que o agente está presente em alta prevalência dependendo da região e da população canina estudada, variando de 4,8% no extremo sul a 70,9% na região Centro-Oeste do Brasil (SILVA et al., 2012). De acordo com Santos (2009) a prevalência do doença pode ser tão elevada em cães assintomáticos (46,7%), quanto em cães sintomáticos (78%).

A prevalência da EMC pode variar em função do clima, devido a fatores epidemiológicos como distribuição do vetor, modo de vida dos animais, as práticas de manejo e o habitat do animal (ALBORNOZ e BOLIO, 2005). A doença é considerada endêmica principalmente nas áreas onde abundam a população do carrapato vetor (MORAES-FILHO et al., 2011). O principal fator de risco para a EMC no país é a exposição direta do cão ao *R. sanguineus* (AGUIAR,2007; CARVALHO et.al., 2008), sendo esta espécie de carrapato predominante entre os cães da área urbana (SZABÓ et al., 2001). O *R. sanguineus* constitui o principal transmissor da EMC no país. Não sendo observada a presença de *E. canis* infectando outras

espécies de ixodídeos no território nacional (LABRUNA et al., 2007). Atualmente o *R. sanguineus*, é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (LABRUNA, 2004).

O risco de infecção por *E. canis* é mais elevado para os cães que vivem em casa quando comparados aos cães que vivem em apartamento. Isso é esperado, porque os animais que vivem em casas com quintais são, teoricamente, mais expostos a carrapatos do que aqueles que vivem em apartamentos (TRAPP et al., 2006).

Atualmente não existem vacinas comerciais para erliquiose e a profilaxia da doença depende do controle da população de vetores, tendo em vista que quanto maior a população desses artrópodes, maior o risco de infecção (PAROLA et al., 2013). A profilaxia está diretamente ligada com o controle da infestação por carrapatos nos cães. O controle de vetores deve ser feito simultaneamente no cão e no ambiente, com o objetivo de impedir a re-infestação nos animais, pois as formas de vida livre do parasita são capazes de sobreviver por longos períodos sem hospedeiros (FORTES et al., 2011). Este controle deve ser feito nos animais com o uso de carrapaticidas (BARR, 2003). No ambiente, o controle deve ser feito com produtos a base de piretróides (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

Entre as drogas eficazes para o tratamento da EMC, as tetraciclinas e seus derivados, oxitetraciclinas, cloranfenicol, enrofloxacina, imidocarb e doxicilina, estão entre as que têm maiores probabilidades de eliminar o agente (DOYLE et al., 2005), sendo doxicilina considerada o tratamento de eleição em todas as fases da doença (TILLEY; SMITH; FRANCIS, 2003), pois esse fármaco alcança uma elevada concentração sanguínea e tecidual, penetrando na maioria das células rapidamente (SOUSA e HIGA et al., 2004). Recomenda-se o uso da doxicilina na dose de 5mg/kg BID ou 10 mg//kg SID, por via oral por pelo menos 28 dias (NELSON e COUTO, 2010).

Mesmo os animais com sinais clínicos graves, a resposta ao tratamento, em geral é muito positiva e sendo em raras exceções, em cães cronicamente afetados, onde a resposta é mínima. A melhora clínica nos cães com a forma aguda ocorre em 24 a 72 horas, e a recuperação completa em cães cronicamente enfermos pode levar até quatro meses (BICHARD; SHERDING, 2008). Mesmo após o tratamento os

animais permanecem com títulos altos de anticorpo por vários meses (DAGNONE et al, 2009).

Em um estudo realizado por Gaunt (2010), em cães experimentalmente infectados, demonstrou-se resultado negativo na PCR após sete dias de tratamento com doxiciclina. Davoust (2013), também demonstrou eficácia da droga em eliminar o agente. De acordo com Theodoro (2013), a rifamicina na dose de 10 mg/kg, por via oral, diariamente durante três semanas, foi parcialmente eficaz na eliminação do agente, mas acelerou significativamente a resolução da trombocitopenia, podendo ser utilizada como tratamento antibacteriano alternativo no tratamento da EMC, principalmente para os cães intolerantes a doxiciclina.

2.2 BABESIOSE CANINA

A babesiose canina é uma doença parasitária de características hemolíticas, transmitida por carrapatos, causando anemia em decorrência da infecção das hemácias por hematozoários do gênero *Babesia* spp., classificados no Filo Apicomplexa, Subfilo Sporozoa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmida e Família Babesiidae. A *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* são as duas espécies capazes de infectar o cão, sendo que *B. canis* é classificada em três subespécies: *B. canis rossi*, *B. canis canis* e *B. canis vogeli* (DUARTE et al., 2008).

No Brasil duas espécies de *Babesia* tem sido relatadas infectando cães, *B. canis vogeli* (SPOLIDÓRIO et al., 2010) e *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006). A *B. canis vogeli* é o piroplasma mais difundido devido à natureza cosmopolita do vetor que atua como seu hospedeiro (IRWIN, JEFERIES, 2004).

A *B. canis* é um hematozoário relativamente grande que parasita as hemácias, sendo chamado de grande babésia, apresenta-se como formas arredondadas, irregulares e em pera. A *B.gibsoni* é um pouco menor, sendo conhecida como pequena babésia (ANTONIO;OLIVEIRA; ZAPPA, 2009; PINTO,2009).

As babésias requerem hospedeiros vertebrados e invertebrados para a manutenção do seu ciclo de transmissão (HOMER et al., 2000) . Os vetores da *Babesia* spp. são os carrapatos pertencentes à família Ixodidae, sendo os principais

responsáveis pela transmissão da doença os da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como carrapato vermelho do cão (ANTONIO;OLIVEIRA;ZAPPA,2009).

O carrapato se infecta pela ingestão de sangue contendo merozoítos durante a sua alimentação no hospedeiro vertebrado. O ciclo de vida envolve a transmissão transtadial e transovariana, resultando na formação dos esporozoítos infectantes presentes nas células da glândula salivar do vetor. Quando os carrapatos infectados se alimentam, os esporozoítos passam com a saliva para a circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado (GREENE,2006).Todas as fases evolutivas do vetor podem transmitir a infecção (ANTONIO;OLIVEIRA; ZAPPA, PINTO,2009). Outra forma de transmissão é através de transfusões sanguíneas com sangue de animais infectados (PINTO, 2009).

Os parasitas se multiplicam por divisão binária no interior das hemácias, resultando em dois indivíduos piriformes, ligados entre si pela extremidade. Esses elementos são liberados pela ruptura das hemácias ou se dividem novamente no interior da célula, produzindo infecção múltipla (ANTONIO;OLIVEIRA; ZAPPA,2009).

A patogenia da babesiose está relacionada à hemólise intra e extravascular, ocasionada por esta multiplicação do parasita no interior dos eritrócitos. O rompimento das células parasitadas leva à anemia, além disso, ocorre liberação de hemoglobina, o que gera hemoglobinúria e bilirrubinemia. A fração direta da bilirrubina, em grande quantidade, leva a uma sobrecarga hepática, causando icterícia, congestão hepática e esplênica, gerando uma hepatoesplenomegalia (NELSON, COUTO, 2010).

Casos mais severos podem envolver hipóxia, choque hipotensivo com coagulação intracelular disseminada, inflamação sistêmica e disfunção múltipla de órgãos. O rompimento dos eritrócitos leva à liberação de substâncias pirógenas, ocasionando um estado febril no animal (SÁ,2007).

A babesiose canina pode apresentar desde um quadro subclínico a grave e até mesmo fatal (SIMÕES et al., 2011). A gravidade dos sinais clínicos, bem como o comprometimento múltiplo de órgãos está relacionada com a intensidade de hemólise promovida pelo hemoparasita, da patogenicidade da cepa envolvida, e de características de susceptibilidade relacionadas ao hospedeiro (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002). No geral, é aceito que a espécie de piroplasma menos

patogênica aos cães adultos seja a *B. canis vogeli*. Em filhotes com três a quatro meses de idade a infecção pode ser fatal (IRWIN, 2009).

Os cães podem ser acometidos por infecções subclínicas, hiperagudas, agudas, crônicas ou atípica, sendo as mais comuns a síndrome hipereaguda, caracterizada por choque hipotensivo e a síndrome aguda, caracterizada por anemia hemolítica (NELSON e COUTO, 2010).

A fase aguda da doença apresenta importante prevalência e atinge principalmente animais jovens entre um e seis meses de idade, não fazendo distinção entre machos e fêmeas (MILKEN et al., 2004; UNGAR DE SÁ et al., 2007). Esta fase se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia, anorexia, letargia e vômito (PINTO, 2009). A fase hiperaguda resulta em febre evoluindo para o aparecimento de mucosas pálidas, perda de apetite, depressão, petéquias e hepatoesplenomegalia (CORREA et al., 2005).

As infecções crônicas caracterizam-se por febre intermitente, hiporexia, perda de peso, fraqueza, esplenomegalia e mais raramente hemoglobinúria e icterícia. Em estado terminal, o animal pode apresentar insuficiência renal e hepática (CORREA et al., 2005).

A forma atípica apresenta uma grande variedade de sinais clínicos, com manifestações gastrointestinais, onde são observados vômito, diarreia, constipação e ulcerações estomacais, manifestações neurológicas caracterizadas por astenia, convulsão e ataxia e manifestações vasculares, como edema, ascite e púrpura (PINTO, 2009).

As manifestações clínicas também podem ser classificadas, de acordo com o comprometimento sistêmico do animal, como complicada e não complicada. Na fase complicada há uma intensa crise hemolítica, fazendo necessária uma terapia com transfusão sanguínea. A fase não complicada é caracterizada por hemólise de baixa intensidade, com sinais brandos e sem a necessidade de transfusão sanguínea (BRANDÃO e HAGIWARA, 2002). De acordo com Pinto (2009), a diversidade de sinais clínicos relacionados a babesiose canina, provavelmente é devido às infecções mistas por *Babesia* spp. e *Ehrlichia canis*.

Com o aumento das hemoparasitoses caninas, decorrente do aumento da população canina e também da população de carrapatos, vem crescendo a preocupação com os métodos diagnósticos dessas doenças (MILKEN et al., 2004).

O diagnóstico clínico não é confiável dado que nenhum dos sinais é patognomônico e podem se apresentar em outras doenças. O diagnóstico pode ser realizado por meio da detecção direta do parasita, durante a parasitemia, onde são encontradas inclusões intraeritrocitárias em esfregaço sanguíneo, principalmente de cães febris (GUIMARÃES, 2004). A visualização dos piroplasmas em esfregaço sanguíneo confirma o diagnóstico e é o suficiente para justificar a realização do tratamento (IRWIN et al., 2010). Porém, em pacientes crônicos ou assintomáticos raramente o parasita é evidenciado, pois quando cessada a fase febril, os mesmos são rapidamente removidos da circulação sanguínea (PINTO, 2009),

O exame microscópico direto do esfregaço sanguíneo é o método convencional mais utilizado para o diagnóstico diferencial para *B. canis* e *B. gibsoni*, utilizando as características morfométricas como base de referência para cada espécie (KEJEMTRUP et al., 2006), porém essa técnica não permite fazer a diferenciação entre as subespécies, para isso tem sido aplicada a técnica de biologia molecular (DUARTE et al., 2008).

Os testes sorológicos são úteis para identificar pacientes assintomáticos e diagnosticar infecções crônicas quando o nível de parasitemia geralmente está baixo ou não detectável no esfregaço de sangue periférico. Porém, a validade diagnóstica dos testes sorológicos é ruim na falta de sinais clínicos e informações do paciente. A RIFI e o Ensaio imunoenzimático (ELISA) são considerados testes com alta sensibilidade e moderada especificidade para detecção de anticorpos contra *Babesia* spp. em cães (FURUTA, 2004).

A RIFI é considerada o teste de referência por ser sensível, porém a especificidade é baixa, pois podem ocorrer reações cruzadas com outras espécies de babesia (VIDOTTO e MANDUCA, 2004). Em estudo realizado no Brasil, Futura et al., (2009) padronizaram e compararam os testes de RIFI e ELISA na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis* na cidade de Jaboticabal em São Paulo, evidenciando maior positividade no teste de ELISA (67%) em relação a RIFI (59%), demonstrando assim, maior sensibilidade do ensaio imunoenzimático.

Os teste sorológicos têm a sua eficácia limitada uma vez que pode ocorrer falso positivo por exposição prévia ao parasita, permanência de anticorpos colostrais em filhotes com até cinco meses após o nascimento. O resultado falso negativo pode ocorrer em infecções recentes, uma vez que são necessários cinco a dez dias para a formação de anticorpos anti – *Babesia* (MAIA, 2005).

A técnica de PCR apresenta uma alta sensibilidade e especificidade (TABOADA e LOBETTI,2006), sendo utilizada para a detecção de fragmentos de DNA de *Babesia* spp. e proporciona o diagnóstico de infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo nos casos de baixa parasitemia. A PCR também pode ser utilizada para monitoramento de terapia, detecção de animais portadores e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica deste patógeno (VIDOTTO et al., 2004).

Resultados falso negativos podem acontecer em casos de babesiose crônica, devido ao nível de parasitemia inferior ao limiar de detecção da reação da PCR ou devido a um estado intermitente de parasitemia. Nestes casos, é aconselhável utilizar um meio diagnóstico sorológico concomitantemente (IRWIN, 2009).

Outras técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas para o diagnóstico e estudo da babesiose canina, entre elas a nested PCR, a semi nested PCR, o polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP-PCR) e PCR em tempo real (COSTA – JÚNIOR et al., 2009).

O parasita causador da babesiose canina foi observado pela primeira vez na Itália. Posteriormente, a doença foi diagnosticada em outros países da Europa, na América, na Ásia e na África. No Brasil, a doença foi descrita pela primeira por Pestana em 1918, em São Paulo, onde o autor descreveu uma nova espécie de agente etiológico o qual denominou *Piroplasma vitalli*, hoje conhecido como *B. canis* (ANTONIO; OLIVEIRA e ZAPPA,2009).

A babesiose canina é uma doença de caráter emergente (IRWIN,2009). No entanto, pouco se sabe sobre a epidemiologia da babesiose canina em cães residentes no país (UNGAR DE SÁ et al., 2007) e sobre os fatores de risco da doença (TRAPP,2006). Entre as protozooses que acometem os cães, a babesiose canina é de maior importância por ser uma enfermidade cosmopolita, e mais

frequente em regiões tropicais e subtropicais (DANTAS – TORRES; FIGUEREDO, 2006).

A alta morbidade causada pela babesiose vem trazendo grande preocupação aos criadores de cães, tanto pelo aspecto afetivo, quanto pelo impacto negativo na comercialização de animais. Além disso, é muito comum encontrar a babesiose associada a erliquiose monocítica canina, o que agrava o quadro clínico e aumento o risco de óbito (UNIGAR DE SÁ et al., 2007)

As vacinas homólogas contra *B. Canis* não protegem contra outras espécies de babésia e apresentam pouca eficácia, além de um custo elevado (SEIXAS et al.,2011). A prevenção de qualquer doença transmitida por carrapatos é melhor conseguida através da remoção da possibilidade de exposição ao vetor (IRWIN,2009). A eliminação efetiva de carrapatos irá exigir uma estratégia de controle integrada, tendo como alvo o cão e o ambiente, pois 95% dos vetores estão no ambiente e apenas 5% nos animais (DANTAS-TORRES, 2008).

Um tratamento para babesiose totalmente eficaz e seguro ainda não está disponível. Um cão no qual foi confirmada a infecção deve ser considerado potencialmente infectado por toda a vida, apesar de tratamentos específicos para a remissão dos sinais clínicos (IRWIN,2010).

O tratamento está direcionado para o controle do parasita, moderação da resposta imune e tratamento sintomático. A eficácia na terapia está relacionada com a espécie de babésia a ser tratada e a disponibilidades de drogas específicas. A *B. gibsoni* apresenta uma menor resposta a terapia quando comparada a *B. canis* e também apresenta uma menor resposta a terapia de suporte (PINTO,2009).

A susceptibilidade aos fármacos varia entre as espécies de *Babesia*. As pequenas babesias, como a *B. gibsoni*, podem apresentar resistência aos fármacos tradicionais e são mais difíceis de ser tratadas, quando comparadas a *B. canis*. Já as grandes babesias demonstram uma boa resposta ao tratamento convencional (SOLANO –GALLEGO,2011).

O dipropionato de imidocarb (Imizol ®) é um fármaco antiprotozoário com alta eficácia contra *B. canis* (BIRKENHEUER, 2012), tendo a capacidade de eliminar a infecção e os sinais clínicos associados. A dose recomendada é de 6,6 mg/kg, por via intramuscular ou subcutânea, com repetição da dose após duas semanas. Este

fármaco atua contra *B. gibsoni*, porém não consegue eliminar a infecção, porém diminui a morbidade e a mortalidade relacionada a esta espécie (BIRKENHEUER; BREITSCHWERDT,2004).

A azitromicina é a medicação de escolha para o tratamento da *B. gibsoni*. O protocolo estabelecido é o de 10 mg/kg, uma vez ao dia, por via oral, durante 10 dias, podendo se associada com atovaquona (BIRKENHEUER, 2012).

O tratamento com associação de antibióticos pode ser utilizado para haver uma diminuição da morbidade e mortalidade da infecção. No entanto, os animais permanecem infectados e a antibioticoterapia é recomendada apenas enquanto não se inicia o tratamento com antiprotozoário ou quando não haja acesso a esse fármaco. Os antibióticos utilizados são a doxiciclina na dose de 5 mg/kg, por via oral a cada 12 horas, 25 mg/kg de clindamicina, por via oral a cada 12 horas e 15 mg/kg de metronidazol por via oral a cada 12 horas, durante três meses (BIRKENHEUER, 2012).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a prevalência da *Ehrlichia* spp. e da *Babesia* spp., detectar a presença dos agentes em amostras de sangue e associar a fatores de risco, em caninos domiciliados da cidade de Palotina, Paraná , Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar coleta de sangue em cães assintomáticos para a identificação de *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. no exame de PCR;
- Detectar a presença de *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. em esfregaço sanguíneo;
- Verificar a prevalência de *Ehrlichia* spp utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta;
- Verificar a prevalência de *Babesia* spp utilizando o teste de ELISA;
- Avaliar os fatores de risco para a babesiose canina e erliquiose monocítica canina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais, sob o protocolo número 33/2015.

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Palotina – Paraná, localizado entre as coordenadas geográficas 24° 12' latitude sul e 53° 50' 30" longitude oeste, com área total de 651 km. O clima de Palotina é subtropical úmido, com verões quentes e invernos frios ou amenos. A média anual de temperatura é de 20°C. O projeto foi realizado nos 33 setores do município (BRASIL, 2010).

4.2 AMOSTRAGEM

Para o cálculo do tamanho da amostra, foi considerada uma prevalência de 5%, erro admitido de 3,5% e nível de confiança de 95% e DEFF de 1,5, totalizando 223 amostras.

Durante o período de novembro de 2015 a janeiro de 2016, foram utilizadas 380 amostras de sangue de cães sem sinais clínicos da doença, provenientes da região de Palotina – PR. Foram coletados em média 7 mL de sangue de cada cão, através de venopunção das veias cefálica ou jugular. Aproximadamente 4 mL de sangue foram acondicionados em tubos sem anticoagulante, para a realização dos testes sorológicos (Imunofluorescência indireta – RIFI para Eriquiose Monocítica Canina e ELISA para Babesiose Canina), e 3 mL armazenado em um tubo com anticoagulante etilenodiamino tetra acético (EDTA), para a realização da PCR. Após a identificação, as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas para a obtenção do soro e posteriormente armazenadas à 20°C negativos, juntamente com as amostras com EDTA, no Laboratório de Biotecnologia (Labiotec) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

4.3 ESFREGAÇÃO SANGUÍNEO

Foi utilizado sangue periférico a partir da punção de capilar marginal de ponta de orelha dos 380 animais para confecção de esfregaços sanguíneos finos, com auxílio de capilares de vidro para obtenção do sangue, lâminas, no total de uma por animal e uma extensora para realização do esfregaço. Após confecção, as lâminas foram fixadas pelo Metanol durante três minutos e corados pela técnica de panótico. Os esfregaços foram avaliados sob microscopia óptica de luz (x1000), para avaliar se havia a presença de corpúsculos de inclusão ou de mórulas sugestivos de *Ehrlichia* spp. nos leucócitos e piroplasmas característicos de *Babesia* spp. em hemácias.

4.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA) PARA *Babesia canis*

O exame foi realizado por meio do Kit Imunodot®, sendo utilizados o soro de 270 cães. O ELISA foi realizado a partir de microplacas fixadas com a proteína recombinante de *Babesia canis*. Em cada microplaca foram incluídos 100 µL soro controle negativo, do soro controle positivo e 100 µL de cada amostra. Depois da aplicação, as microplacas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, seguida por três lavagens em PBS Tween 20. Após secagem, foi adicionado 100 µL do conjugado anti-IgG de cão e as microplacas foram novamente incubadas a 37°C por uma hora em câmara úmida, lavadas três vezes em PBS Tween 20. Após a incubação foi adicionado 100 µL de substrato em cada amostra. As microplacas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas em temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente foram adicionados 50 µL da solução de parada e as microplacas foram examinadas utilizando o filtro de 405 nm, no leitor de ELISA.

Essa etapa foi realizada no laboratório da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC) – *Campus Toledo*.

4.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *Ehrlichia* spp.

A RIFI foi realizada a partir de lâminas fixadas com o antígeno de *E. canis*, cepa Cuiabá #16 (AGUIAR et al., 2013), cultivadas em células DH82 no LVR-HOVET- UFMT, sendo utilizadas 342 amostras de soro de cães. Os soros foram diluídos inicialmente em microplacas a 1:40 (AGUIAR et al., 2007) com PBS (pH 7,2) e aplicado nas lâminas. Em cada lâmina foram incluídos soro controle negativo e soro controle positivo. Após aplicação das amostras, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, seguida por duas lavagem em PBS (pH 7,2) de 10 minutos. Depois da secagem em temperatura ambiente, foi adicionado conjugado de coelho anti-IgG de canino (Sigma Diagnostics®, Estados Unidos) nas amostras de canídeos. As lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida, lavadas por duas vezes em PBS (pH 7,2) por 10 minutos e submetidas a secagem. Posteriormente, adicionou-se nas lâminas glicerina tamponada (pH 8,5) e foram examinadas em microscópio de epifluorescência na objetiva de 40 vezes.

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), na cidade de Cuiabá – Mato Grosso.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 150 µL de amostra de sangue. Foram adicionados 450 µL de solução de isotiocianato de guanidina (GT). Após a adição da GT as amostras foram misturadas em agitador por quatro vezes com intervalo de dois minutos e 30 segundos e foram levadas a centrífuga a uma rotação de 12.000g por 10 segundos. Posteriormente foram adicionados 100 µL de clorofórmio gelado, seguido por um processo de 30 segundos no agitador e cinco minutos na centrífuga com rotação de 12.000g. Depois foram transferidos 400 µL do sobrenadante para novos microtubos e adicionados 600 µL de isopropanol gelado. Os microtubos foram homogenizados por inversão e guardados a 20°C negativos por 12 horas.

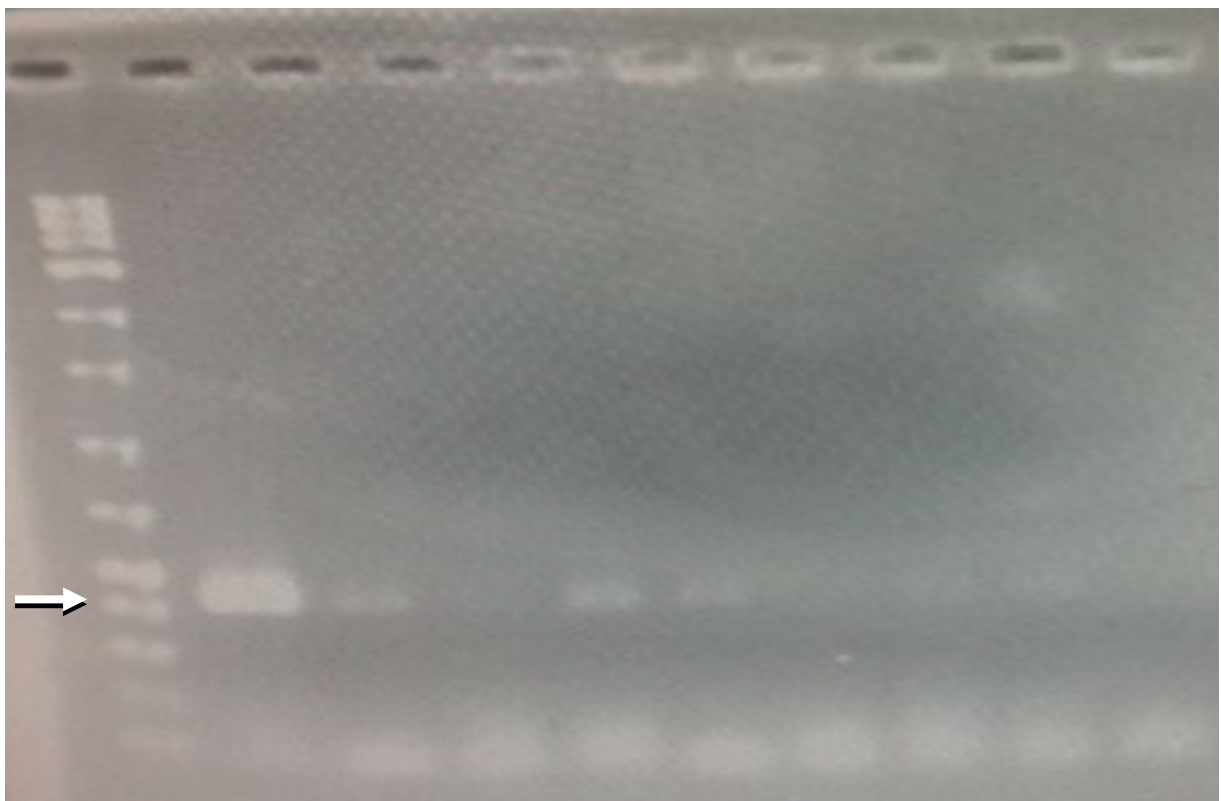
Após 12 horas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, na rotação de 12.000g e posteriormente foram adicionados 800 µL de etanol 70% gelado, que foi misturado no agitador por 15 segundos. As amostras foram novamente centrifugadas a uma rotação de 12.000g durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados para secar com a tampa aberta em temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de água ultra pura e os tubos foram colocados em estufa a 56°C por 15 minutos. As amostras foram misturadas no agitador e centrifugadas durante 10 segundos, após isso, foram congeladas a 20°C negativos (SAMBROOK e RUSSEL,2001).

4.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA *Erlíchia* spp.

Foi realizada a PCR de 233 amostras, utilizando o protocolo de Aguiar et al., (2007). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na PCR foram baseados na sequência parcial do gene 16SrRNA presente em todas as erlíquias: dbs-330 (5' GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e dbs-728 (5' CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT3'). A reação de amplificação realizada utilizou volume total final de 50 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA da amostra, 10mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 20 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, Cloreto de Magnésio (MgCl) a 3mM , 1,25U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão 10X (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e 31,75 µl de água. A sequência térmica e de tempo de amplificação e desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por uma segunda etapa de 50 ciclos contendo desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb DNA Ladder -Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz

ultravioleta (Figura 1). Os controles positivos são amostras da rotina do HOVET/UFMT com visualização em esfregaço sanguíneo e confirmação por meio de PCR e sequenciamento.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos de amplificação de fragmento gênico por PCR. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (409pb). Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular; 2: Controle positivo; 3, 5, 6 e 9: Amostras de campo positivas; 4, 7 e 8: Amostras de campo negativas; 10: Controle negativo



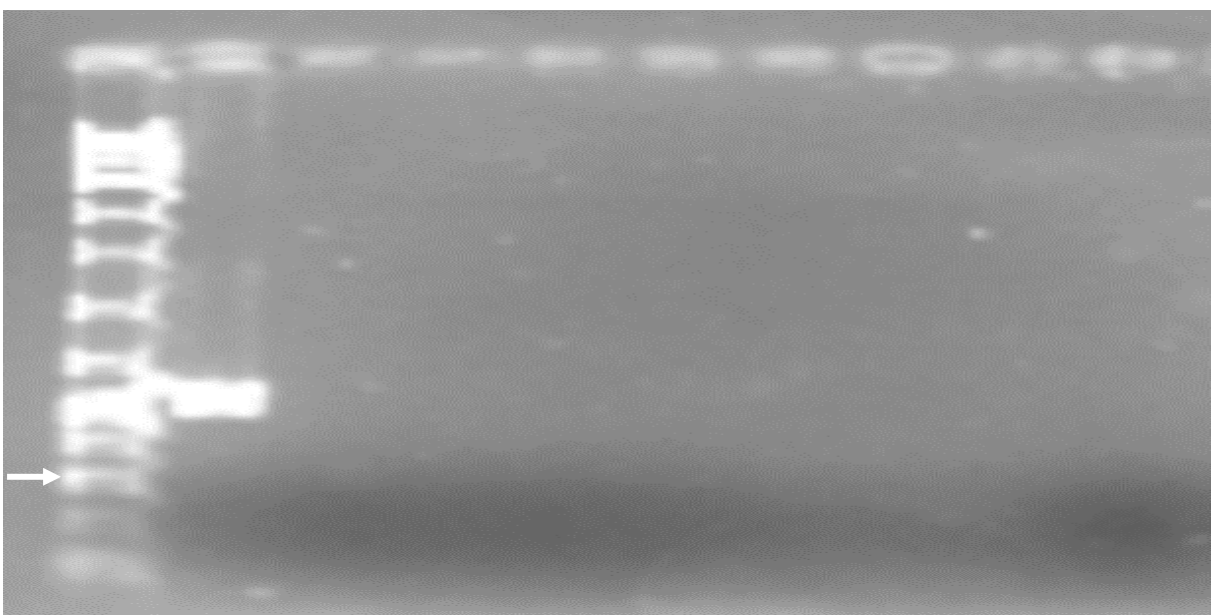
Fonte: O autor (2016).

4.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA *Babesia* spp.

Foram utilizadas 119 amostras, utilizando o protocolo de Almeida (2011). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na PCR foram o Bab143-167 (5' CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC A-3') e o Bab 694-667 (5' GCT TGA AAC ACT CTA RTT TT CTC AAA G 3'). A reação de amplificação realizada utilizou uma reação de volume total final de 50 μ L, contendo uma mistura de 5 μ L do DNA da amostra, 10mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP -

Invitrogen®), 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, Cloreto de Magnésio (MgCl) a 1,5mM , 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão 10X (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e 35,3 µl de água. A sequência térmica e de tempo de amplificação e desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por uma segunda etapa de 35 ciclos contendo desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese será realizada a 100 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb DNA Ladder -Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (Figura 2). Os controles positivos são amostras da rotina do HOVET/UFMT com visualização em esfregaço sanguíneo e confirmação por meio de PCR e sequenciamento.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos de amplificação de fragmento gênico por PCR. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (541pb). Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular; 2: Controle positivo; 3 a 9: Amostras de campo negativas; 10: Controle negativo



4.9 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Após a coleta do material biológico dos animais, foi aplicado um questionário epidemiológico, contendo 33 perguntas (Anexo 1). Os questionários foram identificados de acordo com as amostras dos animais e analisados pelo programa Epi infoTM 7, para a identificação dos fatores de risco associados a prevalência da doença.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA

No presente estudo realizado em Palotina - Paraná, a soroprevalência de cães com anticorpos anti - *E.canis* foi de 25,73% (88/342) (Tabela 1), ficando abaixo da soroprevalência demonstradas em outros trabalhos que utilizaram animais suspeitos, pois se trata de um estudo epidemiológico, onde os animais são selecionados de forma aleatória e todos eram aparentemente saudáveis. Um resultado semelhante foi encontrado em Lavras – Minas Gerais, por Fonseca (2012), onde os cães eram assintomáticos e 23,6% (38/161) dos animais estudados apresentaram anticorpos anti- *E.canis* quando submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI >80). Apesar dos dois estudos usarem animais assintomáticos, a prevalência de cães expostos a infecções por *E. canis*, está dentro da faixa observada por outros autores brasileiros, que demonstram que os valores de soropositividade variam entre 4,8 a 65% em cães da área urbana e rural do país (SAITO, 2009).

A prevalência da EMC varia de acordo com as condições climáticas e fatores epidemiológicos como distribuição do carrapato, média de idade entre os cães, práticas de manejo e ambiente onde os animais vivem e método do ponto de corte utilizado na detecção do agente (VIEIRA,2011). A prevalência da *E. canis* é bem variável entre os estados brasileiros, possivelmente devido aos estudos possuírem metodologias variadas (SILVA et al., 2010). As taxas de infecção por *E.canis* apresentam grande variação de uma região para a outra, sendo maiores nas áreas tropicais e subtropicais, provavelmente por causa da melhor adaptação do carrapato *R. sanguineus* ao clima quente e úmido (LABRUNA et al., 2007).

A prevalência encontrada em Palotina (25,73%), é semelhante a relatada por Trapp et al., (2006), onde demonstrou uma soroprevalência de 23% (87/381) dos cães atendidos em um hospital veterinário na cidade de Londrina, também situada no estado do Paraná. Porém, foi inferior ao resultado encontrado por Silva et al., (2010), na cidade de Cuiabá – Mato Grosso, por Souza et al., (2010), na cidade de Salvador – Bahia, por Azevedo et al., (2011), no semi árido da Paraíba e por Witter et al., (2013), na cidade de Cuiabá – Mato Grosso, cujas prevalências foram de

42,5%, 35,6%, 72,5% e 70,1% respectivamente. Estes resultados mais elevados, podem estar relacionados com o fato desses estudos serem realizados com animais suspeitos de terem a EMC, aumentando a chance de encontrarem anticorpos anti *E. canis* (FONSECA,2012).

Albernaz et al., (2007), relataram a frequência de 13,9% na cidade de Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro e Saito et al., (2008), observam a soroprevalência de 4,8% (19/389) no estado do Rio Grande do Sul, demonstrando assim, a grande variação da prevalência da EMC no Brasil.

Durante a fase aguda da EMC consegue-se identificar as mórulas do parasita em leucócitos através do esfregaço sanguíneo (NAKAGHI et al., 2008), no entanto a sensibilidade do exame microscópico direto é baixa, em torno de 4 a 5% dos casos na fase aguda, sendo difícil ser detectado na fase crônica (SILVA et al., 2010). Em estudo realizado na Bahia, Meneses et al., (2008), observaram a inclusões sugestivas de mórulas de *E. canis* em 5,3% (4/75) dos cães atendidos com suspeita de EMC. Em estudo semelhante, usando animais suspeitos, na cidade de Botucatu – São Paulo, Ueno et al., (2009), relataram encontrar mórulas de *E.canis* em 7,1% (5/70) dos cães.

No presente estudo, foram usados 380 animais assintomáticos, sendo as mórulas identificadas em apenas 1,57% (6/380) das lâminas de esfregaço sanguíneo de ponta de orelha. Fonseca (2012), apresentou resultado similar, ao analisar o esfregaço sanguíneo de 161 cães assintomáticos. Segundo a autora, as mórulas foram visualizadas em apenas três lâminas, perfazendo 2% do material estudado. Esses resultados estão coerentes com o perfil da população canina amostrada (animais assintomáticos), pois de acordo com Silva et al., (2010), as mórulas são mais facilmente detectadas em animais na fase aguda da doença, onde há a presença de sinais clínicos, devido a grande parasitemia.

Apenas 0,58% (1/342) das amostras avaliadas pelo método de RIFI e esfregaço sanguíneo, foram positiva em ambas as técnicas. Entre as 223 amostras avaliadas pelo exame de PCR e esfregaço sanguíneo, uma amostra (0,44%), foi positiva nos dois procedimentos. Este resultado pode estar relacionado com o fato de que a visualização de mórulas é rara durante a fase subclínica e crônica da doença (NAKAGHI,2008).

Dos animais avaliados na PCR 8,96% (20/233) apresentaram a presença do DNA compatível com o gênero *Ehrlichia* spp. pela amplificação do gene *dbpA*, demonstrando um resultado inferior ao encontrado por Witter et al., (2013), onde 23,3% da população estudada foi positiva na PCR para o gênero *dbpA*, porém nesse estudo realizado em Cuiabá, os animais apresentavam sinais clínicos da doença. De acordo com Dagnone et al., (2009), o uso de amostras de sangue para a realização da PCR pode resultar em falso negativo, mesmo nos animais na fase aguda da doença, visto que a parasitemia do agente é normalmente baixa. Este fato pode justificar o baixo número de animais positivos na PCR, pois foram usadas amostras de sangue para a realização do exame, e além disso, os cães não apresentavam nenhum sinal clínico da doença.

Dos 223 cães avaliados na RIFI e na PCR, apenas sete (3,13%) amostras foram positivas nos dois exames, diferentemente do observado por Witter et al., (2013), onde todos os animais positivos na PCR foram positivos no exame sorológico. Neste estudo realizado em Cuiabá, os animais tinham a suspeita de EMC, o que pode aumentar as chances de encontrar anticorpos contra *E. canis* e a presença do DNA de *Ehrlichia* spp. Essa diferença encontrada nos dois estudos, pode estar relacionada com o fato dos animais estudados em Palotina serem assintomáticos, podendo haver infecções subclínicas e crônicas, apresentando anticorpos contra *E.canis*, porém com uma baixa parasitemia, não sendo detectado na PCR.

A PCR é o teste específico mais sensível para a detecção de *E.canis* (VIEIRA,2011), possuindo a vantagem de detectar o DNA do agente etiológico nos primeiros dias após a infecção (SOUZA et al., 2010). É importante ressaltar que embora a sorologia seja útil no diagnóstico de EMC, em áreas endêmicas não é um método conclusivo, pois os cães podem manter os títulos de anticorpos anti- *E.canis* durante meses ou anos, mesmo após a eliminação do agente ou de um tratamento mal sucedido (HARRUS e WARER, 2011), não sendo possível distinguir infecção atual de infecção anterior (NAKAGHI et al., 2010). Nenhuma amostra foi positiva nos três exames (PCR, RIFI e esfregaço sanguíneo).

Tabela 1. Exames realizados para a detecção da presença de *Ehrlichia* spp. em amostras de cães assintomáticos da cidade de Palotina-Paraná.

Exames	Número de amostras (n)	Número de exames positivos	Porcentagem das amostras positivas (%)
RIFI	342	88	25,73
PCR	233	20	8,96
Esfregaço sanguíneo	380	6	1,57
RIFI e PCR	233	7	3,31
RIFI e Esfregaço	342	2	0,58
PCR e Esfregaço	233	1	0,44
PCR, RIFI e Esfregaço	233	0	0

Os fatores de riscos relacionados a EMC canina no município de Palotina estão apresentados na tabela 2. A presença de ectoparasitas, pulgas ($p < 0,001$) e carrapatos ($p < 0,01$), e a falta de uso regular (anualmente) de vermífugos ($p < 0,0005$) foi demonstrada como fator de risco para infecção por *E.canis*. O carrapato marrom do cão, *R. sanguineus*, tem sido considerado o principal vetor para a transmissão da EMC em muitas partes do Brasil (VIEIRA et al., 2011). As condições climáticas de Palotina favorecem o desenvolvimento do vetor e a disseminação da doença. A presença de pulgas e endoparasitas, está relacionada com o manejo do animal e não com a transmissão da EMC. Sendo assim, podemos considerar que os animais que recebem um manejo mais adequado, com uso de produtos antiparasitários, tem uma menor exposição ao vetor da doença.

Em relação ao manejo do animal, aqueles que vivem em regime de criação solto ($p < 0,007$), em locais com a presença de terra e cimento ($p < 0,001$), presença de grama ($p < 0,004$) e presença apenas de terra ($p < 0,02$), são considerados como fator de risco para a EMC. Esses cães apresentam uma maior exposição aos carrapatos, predispondo a presença de *E.canis*. Azevedo et al., (2011), também observou que o regime de criação esta diretamente ligado ao fator de risco da EMC, considerando que animais com acesso à rua são mais expostos à doença. Rotondano (2014), obteve resultados semelhantes em relação ao tipo de criação do animal, observando que animais criados soltos ($p < 0,011$) ou semidomiciliados ($p < 0,0001$) no sertão e semiárido da Paraíba, são considerados como mais

susceptíveis às infestações por *R. sanguineus*, favorecendo a exposição ao agente etiológico da EMC.

Estudos soropidemiológicos revelam que cães adultos do sexo masculino são mais propensos a apresentar a presença de anticorpos anti – *E.canis*, particularmente aqueles com a presença de carrapatos (TRAPP, 2006; COSTA Jr et al., 2007; ROTONDANO, 2014). No presente estudo, o sexo masculino ($p<0,007$) foi considerado como fator de risco da doença. Em um levantamento realizado por Souza et al., (2010), foi observada diferença entre os sexos, com maior prevalência da EMC em machos, este fato pode estar relacionado com o maior acesso à rua desses animais, favorecendo a presença de carrapatos. Esses resultados discordam dos dados encontrados por Borin et al., (2009), onde observaram um maior número de fêmeas portadoras da EMC. Witter et al., (2013) e Silva et al., (2012), não encontraram predileção relacionada a essa variável.

Não foi observada associação significativa relacionada a idade e raça dos animais. Fonseca (2012) e Silva et al., (2010), apresentaram resultado semelhante, não havendo diferença significativa para essas variáveis. Entretanto, Trapp et al., (2006), consideraram que animais acima de um ano fazem parte do grupo de risco para a EMC ($p<0,001$). Carlos et al., (2011), também relataram associação de soropositividade com a idade, relatando que animais entre dois a cinco anos ($p<0,001$) estão mais predispostos a infecções por *E.canis*, pois o longo período de exposição ao vetor é maior nesses animais, aumentando assim, a chance de ter o contato com o agente etiológico.

O principal fator de risco para a EMC é a presença do vetor *R. sanguineus* (CARLOS et al., 2011; AGUIAR et al., 2007), espécie de carrapato predominante entre os cães criados na área urbana, com prevalência de infestação de 30% (SZABÓ et al.,2001). No entanto, no presente estudo não foi observada diferença significativa ($p>0,05$), quando comparados animais da área urbana e da área rural, sendo compatível com os resultados encontrados por Fonseca (2012), e Mello et al., (2011).

Tabela 2. Fatores de riscos associados a *Ehrlichia* spp. no município de Palotina-Paraná, Brasil.

Variável	Valor de p
Manejo	
Pulga	0,001
Carrapato	0,01
Vermífugo	0,0005
Ambiente	
Solto	0,007
Cimento e terra	0,001
Grama	0,004
Terra	0,02
Sexo	
Macho	0,007

*Significativo p menor e igual a 0,05, * As demais variáveis não apresentaram o valor de p significativo.

5.2 BABESIOSE CANINA

As diferenças de soroprevalência ocorrerem possivelmente devido à região geográfica e a incidência do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*, além da resposta individual a hemoparasitas e as diferentes metodologias utilizadas para diagnosticar a babesiose canina (FURUTA et al., 2009).

Em Palotina – Paraná, a soroprevalência da Babesiose Canina foi de 7,41% (Tabela 1), ficando bem abaixo dos resultados encontrados em estudos realizados no Brasil. Sousa (2012) encontrou uma soropositividade de 81,6% dos cães do Centro de Zoonoses de Campo Grande- Mato Grosso do Sul. Guimarães et al., (2009) demonstraram uma soropositividade em 73,3% (220/300), animais do município de Lavras – Minas Gerais. Na cidade de Londrina – Paraná, Trapp et al., (2006), observaram uma soropositividade em 36% dos cães atendidos em um hospital veterinário. A grande diferença pode se dar ao fato dos animais estudados

no presente estudo serem assintomáticos, diferentemente dos animais avaliados nos estudos citados.

No presente estudo, foram confeccionadas 380 lâminas de esfregaço sanguíneo periférico de cães assintomáticos, sendo o protozoário encontrado em apenas 2,36% (9/380) das amostras. Resultado semelhante foi encontrado por Silva et al., (2014), na cidade de Abadia dos Dourados – Minas Gerais, onde foram confeccionadas 150 lâminas de cães sintomáticos, sendo 1,25% positivas para *Babesia* spp. Em 2006, Soares et al., observaram 2% de positividade para esse exame, em Juiz de Fora - Minas Gerais, e Miranda et al., (2008) observaram 1,47% de amostras positivas, pela mesma técnica, no município de Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro.

De acordo com Homer et al. (2000), este método é muito subjetivo, pois depende da experiência do examinador. Além disso, os animais estudados no município de Palotina, não apresentavam sinais clínicos de babesiose, podendo não apresentar ou estar na fase crônica da doença, dificultando assim, a visualização da *Babesia* spp. De acordo com Solano-Gallego e Baneth (2011), este método demonstra um maior nível de sensibilidade quando estão presentes níveis de parasitemia moderado a elevados.

Apenas 0,84% (1/119) das amostras avaliadas pelo método de PCR e esfregaço sanguíneo, foram positivas em ambas as técnicas. Entre as 270 amostras avaliadas pelo exame de ELISA e esfregaço sanguíneo, não foram observadas amostras positivas pelos dois procedimentos. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que nas infecções crônicas ou de baixa parasitemia o diagnóstico citológico de sangue periférico não é totalmente confiável, pois pode não haver a visualização do protozoário (MORREIRA et al., 2005).

A técnica de PCR foi realizada em 119 amostras, sendo apenas duas (1,68%) positivas. Embora essa técnica seja bastante sensível e específica, nos casos de babesiose, ela é considerada pouco sensível nos casos de cães infectados naturalmente, assintomáticos ou na fase crônica da doença (BOOZER e MANCITIRE, 2003). Sousa (2012), encontrou um resultado semelhante, onde apenas 3% (2/60) amostras foram positivas na PCR.

Quando avaliadas pelo método de PCR e ELISA, não houveram amostras positivas em ambos os exames. Sugere-se que isto decorra da parasitemia que pode ser baixa ou flutuante. (IRWIN, 2009). De acordo com Hernández (2010), no

presente estudo, podemos estar frente a esta situação e aqueles animais sorologicamente positivos à *Babesia canis*, poderiam estar cursando a fase crônica ou subclínica da doença, e aqueles PCR positivos estarem apresentando um pico de parasitemia capaz de ser detectado pela técnica. Ainda segundo o autor, em estudo realizado em animais da Colômbia, apenas 5,49% foram positivos no exame de PCR, enquanto 51,64% (47/91) cães foram positivos no exame sorológico.

Tabela 3. Exames realizados para a detecção da presença de *Babesia spp.*, em amostras de cães assintomáticos da cidade de Palotina-Paraná.

Exames	Número de amostras (n)	Número de exames positivos	Porcentagem das amostras positivas (%)
ELISA	270	20	7,41
PCR	119	2	1,68
Esfregaço sanguíneo	380	9	2,36
ELISA e PCR	119	0	0
ELISA e Esfregaço	270	0	0
PCR e Esfregaço	119	1	0,84
PCR, ELISA e Esfregaço	119	0	0

Os fatores de risco para Babesiose Canina na cidade de Palotina estão apresentados na tabela 4. Viver em ambiente urbano demonstrou ser um fator de risco para doença ($p < 0,0024$), considerando que o *R. sanguineus* é o principal carrapato que transmite o parasita no Brasil, principalmente em áreas urbanas (Labruna 2004). Foi observado que animais com acesso à rua tiveram diferença significativa ($p < 0,000$), este fato também se deve a maior exposição ao vetor, favorecendo a infecção por *B. canis*.

Resultados semelhantes aos desse estudo, foram encontrados em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, onde Almeida et al., (2002), compararam a ocorrência de babesiose e erliquiose entre cães de rua e domiciliados, e verificaram que aqueles animais não domiciliados apresentaram prevalência significativamente maior do que os domiciliados.

Em relação ao manejo, a variável banho ($p < 0,02$) demonstrou-se significativo para infecção por *B. canis*. Isto se deve ao fato de que os animais que não tomam banhos com frequência, têm mais chances de estarem exposto ao vetor, tendo em vista que durante o banho, os tutores podem encontrar os carrapatos e fazer a retirada manual, além de providenciarem um produto antiparasitário, afim de evitar

novo contato com o vetor.

O nível de escolaridade dos proprietários foi considerado como fator de risco, quando relacionado aos tutores analfabetos ($p < 0,01$). O grau de instrução está diretamente ligado às condições socioeconômicas, que é responsável pela restrição orçamentária que compromete o controle de carrapatos (FONSECA, 2012). Este dado é confirmado pela associação significativa do não uso de coleiras antiparasitárias ($p < 0,002$). Fato este, que deixa os cães mais expostos às infestações por carrapatos.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às variáveis raça e sexo, corroborando com os dados encontrado por Guimarães et al., (2009) e Trapp et al., (2006)., demonstrando que todos os animais tiveram oportunidades iguais para se infectar com *B. canis*. Em relação à idade, também não foi encontrada associação significativa, discordando com os autores citados acima, que evidenciaram que a frequência de cães positivos aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos animais acima de 12 meses, demonstrando um risco crescente com o aumento da idade.

Tabela 4. Fatores de riscos associados a presença de Babesia spp. no município de Palotina-Paraná, Brasil.

Variável	Valor de p
Manejo	
Banho	0,0022
Coleira antiparasitária	0,0024
Ambiente	
Solto	0,0000
Área urbana	0,0024
Proprietário	
Escolaridade	
Analfabetismo	0,01

*Significativo p menor ou igual a 0,05. As demais variáveis não apresentaram o valor de p significativo.

Casos de co-infecção de EMC e Babesiose são frequentemente encontrados devido ao vetor *Rhipicephalus sanguineus* ser comum entre os cães brasileiros (NAKAGHI et al, 2008), porém no presente estudo, apenas 3,8% (10/380), amostras

foram positivas para ambos os patógenos. Este resultado é similar ao encontrado em uma pesquisa realizada por Leal et al. (2015), onde foi avaliada a associação de diversos hemoparasitas, não sendo identificada a co-infecção por *B. canis* e *E. canis*.

A transmissão de *Babesia canis* e *E. canis* está relacionada à alta incidência do vetor e vem demonstrando uma crescente prevalência de infestações por carrapatos nos cães (LABRUNA, 2004). Entre os animais estudados, apenas 14,2% (10/380), apresentavam pelo menos um carrapato.

A presença de carrapato não foi considerada um fator de risco para Babesiose Canina, no município de Palotina, corroborando com os dados encontrados por Ueno et al., (2009), e Silva et al., (2010), onde também não foi observada associação significativa ($p > 0,05$) entre cães com ou sem infestação por carrapatos.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados no presente estudo podemos concluir que:

- A soroprevalência da erliquiose monocítica canina no município de Palotina, pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta foi de 25,73%;
- A soroprevalência da babesiose canina no município de Palotina, pela técnica de Ensaio imunoenzimático indireto foi de 7,4%;
- Frequência de erliquiose monocítica canina no município de Palotina, de acordo com a técnica de PCR foi de 8,96%;
- Frequência de babesiose canina no município de Palotina, de acordo com a técnica de PCR foi de 1,68%;
- Frequência de erliquiose monocítica canina no município de Palotina, de acordo com a técnica de esfregaço sanguíneo foi de 1,57%;
- Frequência de babesiose canina no município de Palotina, de acordo com a técnica de esfregaço sanguíneo foi de 2,36%;
- As variáveis relacionadas com o sistema de criação do cão (solto e semi-domiciliados), sexo (macho), ambiente (terra, grama e locais com cimento e terra) e manejo (presença de pulga, carrapato e vermes), foram significativos para a EMC no município de Palotina-Paraná;
- As variáveis relacionadas com o sistema de criação do cão (solto), ambiente (área urbana), manejo (frequência de banhos e uso de coleiras antiparasitárias) e o grau de escolaridade do proprietário (analfabeto), foram considerados fatores de risco para a Babesiose Canina no município de Palotina – Paraná;

7 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 126-132, 2007.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.37, p.796-802, 2007.
- AGUIAR, D.M.; ZHANG, X.; MELO, A.L.T.; PACHECO, T.A.; MENESES, A.M.C.; ZANUTTO, M.S.; HORTA, M.C.; SANTARÉM, V.A.; CAMARGO, L.M.A.; MCBRIDE, J.W.; LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.315–321, 2013.
- ALBERNAZ, A. P.; MIRANDA, F. J. B.; MACHADO, J. A.; FAJARDO, H. V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, p.799-806, 2007.
- ALBORNOS, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 75-79, 2005.
- 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. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011
- ALMEIDA, A. J.; PERNI, C. F. R.; MARIANO, F. A. et al. Ocorrência de *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. associada a parâmetros eritrocitários em caninos domiciliados e não domiciliados em Campos- RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. 12., 2002. Rio de Janeiro- RJ. RIO DE JANEIRO, 2002
- ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. **Rio de Janeiro: NDL.F. Livros**, 2002.
- ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.49-54, 2005.
- ALVES, M. L.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de Indicadores e Protocolo para o Diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.49-54, 2004.
- ANTONIO, N.S.; OLIVEIRA, A.C.; ZAPPA, V. *Babesia canis*: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2009.

AZEVEDO, S. S.; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F.; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. F.; UCHÔA, I. C. P. Seroprevalence and risk factors associated to *Ehrlichia canis* in dogs from the semi-arid of Paraíba State, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, p.14-18, 2011.

BARR, C. S.; BOWMAN, D. D. Doenças infecciosas e parasitárias em cães e gatos. **Consulta em 5 minutos**. Rio de Janeiro, p.618, 2010.

BARR, S. C. Erliquiose. In: SMITH, F. W. K.; TILLEY, L. P. **Consulta Veterinária em 5 minutos: espécie canina e felina**, São Paulo, 2003.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais . 3. ed.** São Paulo Editora: Roca, 2008.

BIRKENHEUER, A. Babesiosis. **Infectious Diseases of the Dog and Cat: Elsevier Science Health Science Division**, 2012.

BIRKENHEUER, A.; BREITSCHWERDT, E. Canine babesiosis. **Standards of Care, Emergency and critical care medicine: Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, 2004.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K.; **Canine babesiosis. Veterinary Clinical Small Animal**. v.33, p.885-904, 2003;

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hemtológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p. 566-571, 2009.

BRANDÃO, L.; HAGIWARA, M.K. Babesiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v.41, p.50-59, 2002.

BRASIL.IBGE. Censo demográfico 2010. Palotina, 2010.

BREITHSCHWERDT, Edward B. Riquetsioses. In: ETTINGER, Stephen J; FELDMAN, Edward C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5ed^a**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, p. 424-426, 2004.

CARDENAS, A. M. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.123-128, 2007.

CARLOS, R. S. A. et al. Risk factor and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.210-214, 2011.

CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v.2, p.29-31, 2007.

CARVALHO, F. S. et al. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetic Molecular Research**, v.7, p.657-662, 2008.

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

CORREA, A. A. R.; NASCIMENTO, M. V.; FARIA, L.S.; BISSOLI, E.D'A.G.; PENA, S.B. Babesiose canina: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2005.

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

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

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

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

DAVOUST, B.; MEDIANNIKOV, O.; CHENE, J.; MASSOT, R.; TINE, R.; DIARRA, M.; DEMONCHEAUX, J.P.; SCANDOLA, P.; BEUGNET, F.; CHABANNE, L. Study of ehrlichiosis in kennel dogs under treatment and prevention during seven months in Dakar (Senegal). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.36, p.613-617, 2013.

DE CAPRARIS, D. Evolution of clinical, haematological and biochemical finding in young dogs naturally infected by vectorborne pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.206-212, 2011.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* spp. by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the *dsb* gene. **J Mol Diagn**, v.7, p.504-510, 2005.

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

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

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Textbook of Veterinary Internal Medicine. **Editora Saunders Elsevier**, 2010.

FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparison of nested-PCR with blood smears examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, p.58-62, 2009.

FONSECA, J. P. **Erlíquiose Canina em Lavras, Sul de Minas Gerais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2012.

FORTES, F.S.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Febre Maculosa Brasileira em Cães. **Ciências Agrárias**, v.32, p.339-354, 2011.

FURUTA, P. I.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, M.; ROCHA, A.; MACHADO, R.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.41-45, 2009.

FURUTA, P.I.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROCHA, A.G.; TINUCCICOSTA, M. Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-teste) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. **Rev. Bras. Parasitol.**, v.13, p. 231, 2004.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Vet. J.**, v.175, p.212-217, 2007.

GALVÃO, M.A.; SILVA, L.J.; NASCIMENTO, E.M.; CALIC, S.B.; SOUSA, RD.; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. **Revista de Saúde Pública**, v.39, p.850-856, 2005.

GARCIA FILHO, S.P.; DIAS, M.A.; ISOLA, J.G.M.P.; MATINS, L.L. Erlíquiose canina: Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.14, n.RC07, 2010.

GASSER, A. M.; BIRKENHEUER, A. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.37, p.41-48, 2001.

GAUNT, S.D.; BEALL, M.J.; STILLMAN, B.A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites and vectors**, v.3, p.33, 2010.

GREENE, C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. **St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier**, v.3, 2006.

GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Factors associated the seropositivity for *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* in dogs attended at nine veterinary clinics in the municipality of Lavras, MG. **Rev. Bras. Parasitol**, v.18, p.49-53, 2009.

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

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S.; Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4488– 4490, 2004.

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

HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. Ehrlichia and anaplasma infections. **Infectious diseases of the dog and cat**, p. 227-238, 2012

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vectorborne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology, Oxford**, v. 35, v. 11-12, p. 1309-1318, 2006.

HÉRNANDEZ ,G. V. Detecção Parasitológica, Molecular Sorológica De Ehrlichia Canis E Babesia Canis Em Cães Da Região Centro - Oriental Da Colômbia. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal – São Paulo, 2010.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.451-469, 2000.

IRWIN, P.J. Canine babesiosis. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v.40, p.1141-1156, 2010.

IRWIN, P.J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasite & Vectors**, v.2, doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4, 2009.

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

IRWIN, P.J.; JEFFERIES, R. Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. **Trends in Parasitology**, v.20, p.27–34, 2004.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; JARDINE, J. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of Babesia gibsoni in dogs. **Aust Vet J**, v.85, p.459-463, 2007.

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

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

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.189-195, 2007.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica veterinária**, v.30, p.24-31, 2001.

LEAL, P. D. S. A.; MORAES, M. I. M. R.; BARBOSA, L. L. O.; LOPES, C.W.G. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, **BrasilRev**, v.37, p.55-62, 2015.

LEGATZKI, K.; JORGE, P.S. Erliquiose canina. **Clínica Veterinária**, 2002.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinical North American Small Practice**, v.40, p.1121-1140, 2010.

MACEDO, A.B.; LEAL, E.R.V. Ehrlichiose canina: estudo retrospectivo e principais achados hematológicos. **Revista Nosso Clínico**, v.45, p.30-34, 2005.

MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.53-57, 2004.

MAIA, M.G. **Aspectos epidemiológicos da babesiose canina em área semi-árida do estado de Minas Gerais**. 2005. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2005.

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

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

MENESES, S. D. I. et al. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.9, p.770-776, 2008.

MILKEN, V.M.F.; CABRAL, D.D.; FIGUEIREDO, J.F.; GONÇALVES, C.L. Ocorrência de babesiose canina no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.7, p.19-22, 2004.

MIRANDA, F. J. B.; ALBERNAZ, A. P.; MELO JÚNIOR, O. A.; MACHADO, J. A. Frequência de cães infectados por Babesia spp. em Campos de Goytacazes, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.238-241, 2008.

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 Tropica**, v.117, p.51-55, 2011.

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

MOREIRA, S.M.; MACHADO, R.Z.; PASSOS, L.F. Detection of Ehrlichia canis in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v.3, p.958-960, 2005.

NAKAGHI, A.C.; MACHADO, R.Z.; FERRO, J.A.; LABRUNA, M.B.; CHRYSSEAFIDIS, A.L.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using Ehrlichia canis p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p. 75-79, 2010.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 3, 2008.

NAKAGHI, A.C.H. **Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de Ehrlichia canis em cães com suspeita clínica de erliquiose.** 2004. 63f. Dissertação - (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: Patologia Animal) – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP. 2004.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (E. canis, E. chaffeensis, E. ruminantium, N. sennetsu, and N. risticii infections). **Infectious Diseases of the Dog and Cat.**, p.203-216, 2006

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. Editora Elsevier, 4ª edição. Rio de Janeiro - RJ, 2010. Páginas: 1325 e 1326

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. First report of Ehrlichia ewingii detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, p.55- 56, 2009.

ORIÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela Ehrlichia canis.** 2001. 89f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.

OTRANTO, D. Managing canine vector borne diseases of zoonotic concern. Trends in Parasitology, **Cambridge**, v.25, p.228–235, 2009.

PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.37-64, 2003.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M.B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M.Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p. 657-702, 2013.

PEREZ, P. et al. Ehrlichia canis detection in symptomatic humans in Venezuela. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIALDISEASES, 4., 2005, Espanha. Anais American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005. p. 45.

PINTO, R.L. **Babesiose canina – relato de caso.** 2009. 26f. Monografia (Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Departamento de Ciências Animais, Porto alegre. 2009.

RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES-JÚNIOR, D. S.;

ROTANDANO, T. E. F. **Doenças transmitidas por carrapatos em cães na mesoregião do sertão e agreste do estado da Paraíba.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Pós graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. 2014.

SÁ, A.G. **Babesiose canina.** 2007. 48f. Monografia (Especialização em Patologia Clínica Veterinária) - Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro. 2007.

SAITO, T. B. **Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados.** 2009. 127 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

SAITO, T. B. et al. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.79, p.102-108, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, v. 3, p. 2231, 2001.

SANTAREM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*.** 2003, 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Botucatu. 2003.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN, C. M.; MORRISON, D. A. Babesia: A world emerging. **Infection Genetics and Evolution**, v.12. p.1788-1809, 2012.

SEIXAS, R.; ALHO, A.M.; GUERRA, D.; CARVALHO, L.M. Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências! **Veterinary Medicine**, v.13, p.18-36, 2011.

SILVA, G. C.; BENITEZ ADO, N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; ARLINGTON, S. H.; VIDOTTO, O. Occurrence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in household dogs from northern Parana. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.379-385, 2012.

SILVA, J. N. Soroprevalência de anticorpos anti-erlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.108-111, 2010.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A.V.; MENDONÇA, G. A.; MUNDIM, M. J. S.; GUIMARÃES, E.C. Hemoparasites In Domestic Naturally Infected Dogs, From Urban And Rural Areas Of Abadia Dos Dourados Municipality, State Of Minas Gerais, Brazil. **Biosci. J.**, v.30, p.892-900, 2014.

SIMÕES, P. B.; CARDOSO, L.; ARAUJO, M. Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission. **Parasit Vectors**, p.4-50, 2011.

SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamento e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.13-16, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats--expanding parasitological and clinical spectra. **Vet Parasitol**, v.181, p.48-60, 2011.

SOUSA, K. C. M. **Co-Infecção Por Ehrlichia Canis, Leishmania Chagasi E Babesia Canis Em Cães Naturalmente Infectados Em Campo Grande, Mato Grosso Do Sul**. 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal – São Paulo. 2012.

SOUSA, V.R.F.; ALMEIDA, A.B.P.F.; BARROS, L.A.; SALES, K.G.; JUSTINO, C.H.S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T.C.B. Avaliação Clínica e Molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v.40, p.1309-1313, 2010.

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

SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTE, D. S.; ROSAS, E. O.;

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsioses. **Brazil Emerg Infect Dis**, v.16, p.521–523, 2010.

SOUSA, M.G.; HIGA, A.C.; GERARDI, D.G.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z. Tratamento da Erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina , precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.3, n.2, p. 126-130, 2004

STICH, R. W. et al. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.256-273, 2008.

SZABÓ, M. P. J. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v.25, p.909-916, 2001.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. G. Babesiosis In: Greene CE, ed. **Infectious Diseases Of The Dog And Cat**. P.722, 2006.

THEODOROU, K.; MYLONAKIS, M.E.; SIARKOU, V.I.; LEONTIDES, L.; KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K.; KRITSEPI-KONSTANTINOY, M.; BATZIAS, G.; FLOURAKI, E.; EYAL, O.; KONTOS, V.; HARRUS, S. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.68, p.1619-1626, 2013.

TILLEY, L. P.; SMITH, JUNIOR.; FRANCIS, W. K. Consulta veterinária em 5 minutos. **2. ed. Barueri: Manole**, 2003.

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

UENO, T. E. H. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.57-61, 2009.

UNGAR DE SÁ, M.F.M.; UNGAR DE SÁ, J.E.; BITTENCOURT, D.V.V.; BISPO, A.C.; RÉGIS, A.M.M.; SOUZA FILHO, N.J.; GOMES NETO, C.M.B.; SOUZA, B.M.P.S.; BITTENCOURT, T.C.C.; FRANKE, C.R. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p.178-183, 2007.

VIDOTTO, O.; MANDUCCA, S. Babesiose canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIKETSIOSES, 1., 2004

VIEIRA, R. F. C. Erliquiose no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.1-12, 2011.

WANER, T.; STRENGER, C.; KESARY, A. Comparison of a clinicbased ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of ehrlichia canis antibodies in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.240-244, 2000.

WITTER, R. et al., Prevalence of canine monocytic ehrlichiosis and canine thrombocytic anaplasmosis in dogs suspected of hemoparasitosis in Cuiabá Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p.3811-3822, 2013.

ANEXO 1**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – SETOR PALOTINA****QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO Nº:**

1. Questionário epidemiológico

I. IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO:	DATA: / /
1. NOME:	
2. ENDEREÇO: BAIRRO:	
3. GRAU DE ESCOLARIDADE: () Analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo	
4. RENDA FAMILIAR: () Menos de 2 salários mínimos () 2 a 4 salários mínimos () 5 a 6 salários mínimos () mais de 6 salários mínimos	
II. DADOS DOS CÃES	
5. NOME DO ANIMAL:	
6. SEXO: () MACHO () FÊMEA	
7. RAÇA: () Sem raça definida () Com raça definida Qual? _____	
8. IDADE: () 0 a 12 meses () 13 a 24 meses () 25 a 48 meses () 4 a 6 anos () Acima de 6 anos	
III. MANEJO DO ANIMAL:	

<p>9. TIPO DE CRIAÇÃO: () Domiciliar – dentro de casa () Domiciliar – canil () Semi domiciliar () Solto</p>
<p>10. TIPO DE TERRENO ONDE O ANIMAL É CRIADO: () Cimento () Terra () Cimento e terra () Grama () Outros: _____</p>
<p>11. ALIMENTAÇÃO: () Comida caseira () Ração comercial () Ambas</p>
<p>12. TEM CONTATO COM OUTROS ANIMAIS? () Não () Sim. Quais? () Cães () Felinos () Equídeos () Bovinos () Suínos</p>
<p>13. EXISTE CRIAÇÃO DE ANIMAIS EM CASA? () Não () Sim. Qual? () Suínos () Aves () Bovinos () Outros. Qual? _____</p>
<p>14. JÁ OBSERVOU ALGUM ANIMAL SINANTRÓPICO OU SILVESTRES? () Roedores () Raposas () Marsupiais () Cachorro do mato/ lobo</p>
<p>15. É REALIZADO A LIMPEZA DO LOCAL ONDE FICAM OS ANIMAIS? () Não () Sim FREQUENCIA: () Diariamente () Semanalmente () Quinzenal () Mensal</p>
<p>16. JÁ ENCONTROU CARAPATO NO ANIMAL? () Não () Sim</p>
<p>17. REALIZA CONTROLE DE ECTOPARASITÁS? () Não () Sim () Coleira antiparasitária () Produtos pour- on () Banhos com xampu antiparasitário</p>
<p>18. FREQUÊNCIA DE BANHOS: () Semanalmente () Quinzenalmente () Mensalmente () Trimestral () Semestralmente () Anualmente</p>

19. REALIZA CONTROLE AMBIENTAL DE ECTOPARASITAS? () Sim () Não FREQÜÊNCIA : () Semanalmente () Quinzenalmente () Mensalmente () Trimestral () Semestralmente () Anualmente
20. O animal foi vacinado quando filhote? () sim () não
21. Qual vacina? () importada () nacional
22. Quem vacinou? () veterinário () agropecuária () próprio dono () outro quem? _____
23. O animal é vacinado todo ano? () sim () não
24. Quais vacinas? () raiva () cinomose/parvovirose () outra qual? _____
25. Já foi observada a presença de vermes nas fezes desses animais? () sim () não
26. O animal é desverminado com qual freqüência? () >3meses () 3-6 meses () 6-12 meses () >1 anos
27. O animal já apresentou alguma doença? () sim () não Qual doença? _____
28. O animal já foi ao veterinário? () sim () não
29. Qual a alimentação do animal? () ração () comida () polenta () carne crua () outro _____
IV. PARA USO DOS AVALIADORES
30. ÁREA RURAL () ÁREA URBANA ()
31. PRESENÇA DE GRAMADO NA CASA: () Não () Sim
32. TAMANHO DO PELO DO ANIMAL: () Curto – até 3 cm () Longo - > 3cm
33. PRESENÇA DE ECTOPARASITAS: () Não () Sim () Pulga () Carrapato

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA O USO DE ANIMAIS

Eu, _____(nome), _____
 (nacionalidade), _____ anos, _____ (estado civil), residente à
 _____ (endereço), _____
 (CPF/RG), estou sendo convidado a participar de um estudo denominado *PREVALÊNCIA DA ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA E BABESIOSE CANINA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS*, cujos objetivos e justificativas são: realizar o diagnóstico da erliquiose monocítica canina e babesiose canina em cães residentes em Palotina.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a coleta de sangue periférico (ponta de orelha) e sistêmico (veia cefálica ou veia jugular) e de carrapatos para a avaliação da presença dos agentes em laboratório.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: o diagnóstico das doenças com prescrição do tratamento nos casos positivos da doença.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Silvia Cristina Osaki, Priscila Pereira, Wellington Augusto Senhorini, Luciana Wolfran, Thiago Letti, Juliana Cristine Anzolim, Liliane Oliveira de Paula, Felipe Gustavo Garcia, Euclides Mario Pieri, Wellington Chan e com eles poderei manter contato pelos telefones (44) 9822-706 e (41) 9652-2140.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Palotina, de de 20....

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)