

OCORRÊNCIA DE *Babesia sp.*, *Ehrlichia canis* E *Hepatozoon canis* EM CÃES DOMICILIADOS, EM DOIS MUNICÍPIOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO – BRASIL.

Joyce Bittencourt¹
Emy Hiura²
Samilla Alves Sobral
Fernanda de Toledo Vieira³
Fábio Ribeiro Braga²
Fernando Luiz Tobias²
Daniel Moura de Aguiar⁴
Helio Langoni⁵

RESUMO

As doenças transmitidas por carrapatos são afecções de grande importância na clínica médica de pequenos animais, devido à alta casuística e ampla distribuição vetorial no território brasileiro. Os principais agentes responsáveis pelas infecções em cães são *Babesia sp.*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*. Os animais infectados são assintomáticos ou apresentam sinais clínicos inespecíficos, sendo necessário a utilização de testes diagnósticos para definição do agente etiológico, e diagnóstico seguro. O objetivo do presente estudo foi determinar a ocorrência desses micro-organismos em cães naturalmente infectados, domiciliados nos municípios de Vila Velha e Anchieta, Espírito Santo, utilizando diferentes testes de detecção: Reação em cadeia polimerase (PCR), sorologia para detecção de anticorpos anti *Ehrlichia canis* e pesquisa de hematozoários em esfregaço sanguíneo. Foram analisadas 65 amostras de sangue obtidas por venopunção da veia cefálica. No teste de PCR, 4,62% dos animais foram positivos para *Babesia vogeli* e 1,54% para *Ehrlichia canis* sendo os resultados para *Hepatozoon canis* negativos. No teste sorológico para *E. canis* 90,77% dos animais foram positivos para a presença de anticorpos, e na pesquisa em lâminas de esfregaço sanguíneo 3,02% apresentavam outros hemoparasitas. Os resultados indicam a dispersão desses hemoparasitas na população canina da região de estudo, entretanto com baixa ocorrência. O teste de PCR demonstrou-se como o mais sensível no qual *Babesia vogeli* foi o agente mais observado.

Palavras-chave: cães, hemoparasitas, *Ehrlichia canis*, *Babesia sp.*, *Hepatozoon canis*.

OCCURRENCE OF *Babesia sp.*, *Ehrlichia canis* AND *Hepatozoon canis* IN DOMICILED DOGS IN TWO MUNICIPALITIES OF THE STATE OF ESPÍRITO SANTO – BRAZIL.

ABSTRACT

Tick-borne diseases are of great importance in the medical practice of small animals, due to the high casuistry and wide vectorial distribution in the Brazilian territory. The main agents responsible for infections in dogs are *Babesia sp.*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis*. Infected animals are asymptomatic or present nonspecific clinical signs, requiring the use of

¹ Mestrando em Ciências Animal da Universidade Vila Velha. * Correspondência: jdfb.vet@gmail.com

² Docente da Universidade Vila Velha, Brasil. Emy.Hiura@uvv.br

³ Docente do Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Vila Velha, Brasil fetvieira@uvv.br

⁴ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso. danmoura@ufmt.br

⁵ Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu. helio.langoni@unesp.br

diagnostic tests to define the etiologic agent, and safe diagnosis. The objective of the present study was to determine the occurrence of these microorganisms in naturally infected dogs domiciled in the municipalities of Vila Velha and Anchieta, Espírito Santo, using different detection tests: polymerase chain reaction (PCR), serology to detect antibodies against *Ehrlichia canis* and research of hematozoa in blood smears. Sixty-five blood samples obtained by venipuncture of the cephalic vein were analyzed. In the PCR test, 4.62% of the animals were positive for *Babesia vogeli* and 1.54% for *Ehrlichia canis*, and the results for *Hepatozoon canis* were negative. In the serological test for *E. canis*, 90.77% of the animals were positive for the presence of antibodies, and in the research in blood smear slides, 3.02% presented other hemoparasites. The results indicate the dispersion of these hemoparasites in the canine population of the study region, however with low occurrence. The PCR test proved to be the most sensitive, in which *Babesia vogeli* was the most observed agent.

Keywords: dogs, hemoparasites, *Ehrlichia canis*, *Babesia sp.*, *Hepatozoon canis*.

OCURRENCIA DE *Babesia sp.*, *Ehrlichia canis* Y *Hepatozoon canis* EM PERROS DOMICILIADOS EM DOS MUNICIPIOS DEL ESTADO DE ESPÍRITO SANTO – BRASIL.

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas son enfermedades de gran importancia en la práctica médica de los pequeños animales, debido a la alta casuística y amplia distribución vectorial en el territorio brasileño. Los principales agentes responsables de las infecciones en los perros son *Babesia sp.*, *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*. Los animales infectados son asintomáticos o presentan signos clínicos inespecíficos, siendo necesario el uso de pruebas diagnósticas para la definición del agente etiológico, y el diagnóstico seguro. El objetivo del presente estudio fue determinar la ocurrencia de estos microorganismos en perros infectados naturalmente, domiciliados en los municipios de Vila Velha y Anchieta, Espírito Santo, utilizando diferentes pruebas de detección: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología para detectar anticuerpos anti *Ehrlichia canis* e investigación de hematozoos en frotis de sangre. Se analizaron sesenta y cinco muestras de sangre obtenidas por venopunción de la vena cefálica. En la prueba PCR, el 4,62% de los animales fueron positivos para *Babesia vogeli* y el 1,54% para *Ehrlichia canis*, y los resultados para *Hepatozoon canis* fueron negativos. En la prueba serológica para *E. canis*, el 90,77% de los animales fueron positivos a la presencia de anticuerpos, y en la investigación en láminas de frotis de sangre el 3,02% presentaron otros hemoparásitos. Los resultados indican la dispersión de estos hemoparásitos en la población canina de la región de estudio, aunque con una baja presencia. La prueba PCR resultó ser la más sensible, en la que *Babesia vogeli* fue el agente más observado.

Palabras clave: perros, hemoparásitos, *Ehrlichia canis*, *Babesia sp.*, *Hepatozoon canis*.

INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses transmitidas por carrapatos são doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e protozoários que acometem diversas espécies de animais domésticos e silvestres em todo o mundo, sendo de importância para a saúde pública devido ao potencial zoonótico (1). No Brasil, os agentes etiológicos de maior relevância encontrados em cães domésticos são *Ehrlichia canis*, *Babesia sp.* e *Hepatozoon canis* (2).

Ehrlichia spp. é uma bactéria gram-negativa pertencente a família *Anaplasmataceae* e se caracteriza por ser um parasita intracelular obrigatório de leucócitos mononucleares (3). *Babesia* sp. e *Hepatozoon canis* são protozoários integrantes do Filo Apicomplexa, ordem *Piroplasmida*, que parasitam eritrócitos e leucócitos (neutrófilos e monócitos) de mamíferos, respectivamente (4).

A transmissão ocorre no momento do repasto sanguíneo pelo vetor, os carrapatos do gênero *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyoma* sp., ou por ingestão destes, no caso do *Hepatozoon canis*, e ainda por meio de transfusões sanguíneas (5, 6).

Os cães infectados por esses micro-organismos são, em sua maioria, assintomáticos ou apresentam sinais clínicos inespecíficos, como febre, anemia, letargia, anorexia, caquexia e casos mais graves resultam em óbito. Os principais achados laboratoriais são anemia, trombocitopenia e leucocitose (1, 7, 8). A presença de alterações hematológicas depende do estágio da doença, visto que é necessário que o agente esteja circulante (1, 9).

Devido à similaridade dos sintomas e a possível coinfeção entre esses parasitos (8, 10, 11), é necessário o diagnóstico diferencial para identificar o agente responsável pela infecção, e subsidiar o tratamento correto, a fim de se evitar o agravamento da doença, quando for o caso, e até a morte do animal.

O diagnóstico das hemoparasitoses se baseia na associação das apresentações clínicas, achados hematológicos e realização de outros testes diagnósticos, como pesquisa em lâminas de esfregaço sanguíneo, ensaios sorológicos e análise molecular (7).

O exame direto consiste na visualização de corpúsculos de inclusão nas células infectadas (hemácias ou leucócitos), porém a sensibilidade do teste depende da carga parasitária, ou seja, que haja alta parasitemia, que é observada na fase aguda da doença. Os testes sorológicos são indiretos e se baseiam na detecção de anticorpos circulantes, entretanto podem ocorrer reações cruzadas, não sendo também possível, distinguir infecções ativas de infecções prévias. A análise molecular, por outro lado, tem demonstrado maior especificidade e sensibilidade que os demais testes, e possibilita a diferenciação de espécies e subespécies dos agentes envolvidos, na infecção ou doença (7,12).

O presente trabalho teve como objetivo diagnosticar e determinar a frequência de hemoparasitas, utilizando diferentes testes diagnósticos testes rápidos para detecção *Ehrlichia* spp. e PCR para pesquisa de *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, e avaliar as alterações hematológicas, na infecção ativa, em amostras de sangue de cães domiciliados nos municípios de Vila Velha e Anchieta, Espírito Santo.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de material biológico foi previamente aprovada pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha. Número de aprovação do comitê de ética, protocolo 415-2017.

No período entre dezembro de 2017 a julho de 2018, foram coletadas amostras de sangue periférico de 65 cães (raças, idade e sexo variados) domiciliados em abrigos para animais, de dois municípios do estado do Espírito Santo, Brasil (Vila Velha e Anchieta).

As amostras foram coletadas em tubo com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e em tubo sem anticoagulante, por meio de punção venosa feita em jugular ou cefálica, e refrigeradas para posterior análise no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário “Prof. Ricardo Alexandre Hippler” da Universidade Vila Velha. Os soros foram separados mediante centrifugação a 3.000 rpm, durante cinco minutos.

A realização do hemograma foi feita mediante o uso do analisador hematológico Mindray® ou manualmente, utilizando diluição sanguínea colocada em um hemocítmetro

(câmara de Neubauer), sendo as células contadas durante a observação microscópica (13), ambos os métodos disponibilizaram a concentração celular.

Para a confecção das lâminas de esfregaço sanguíneo foi utilizada a técnica da cunha, também chamada de método do deslizamento (14). As lâminas foram coradas com Kit de coloração panótico (Instant Prov[®], Coloração diferencial rápida em hematologia, Newprov[®]), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, foi efetuada a avaliação das principais linhagens celulares (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) e a pesquisa pelos parasitas intracelulares por meio da observação de alta magnificação (objetiva de 100x) em óleo de imersão.

A sorologia para *E. canis* das amostras, de sangue e soro, foi realizada pelo teste detecção de anticorpos IgG (ImmunoComb Canine *Ehrlichia*, Biogal Galed Labs), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram classificados como negativo ou positivo, sendo o último também avaliado quanto a titulação de anticorpos.

Para a análise molecular foi realizado a extração do DNA total das amostras de sangue, previamente congeladas à - 20°C, usando o kit de extração comercial (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

No teste de reação em cadeia polimerase (PCR) foram utilizados os seguintes primers para a detecção de *Babesia* sp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. (Tabela 1): BAB1 senso e BAB4 anti-senso, que amplificaram um fragmento com cerca de 590 bp das regiões conservadas dos genes 18S rRNA e 28S rRNA de *B. vogeli* (15); Dsb-330 senso e Dsb-481, que amplificaram um fragmento de 176 bp correspondente ao gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. (16); HEPF senso e HEPR anti-senso, entretanto não houve amplificação do gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp. (17).

Para cada ensaio de PCR, foram utilizadas amostras sanguíneas de cães naturalmente infectados por *B. vogeli*, *H. canis* e *E. canis*, como controle positivo (2) e água ultrapura para o controle negativo.

Todos os produtos da PCR, acrescidos de corante de ácido nucleico (GelRed[®] Nucleic Acid Gel Stain, Biotium), foram analisados em gel de agarose 1,5% e visualizados com um sistema de captura de imagem (Molecular Imager[®] ChemiDoc[™] XRS System, Bio-Rad). As amostras que revelaram bandas na altura do controle positivo foram consideradas positivas.

Tabela 1. Lista de primers utilizados nas PCR's dos DNA's extraídos das amostras sanguíneas coletadas de cães no Espírito Santo, Brasil.

Organismo Alvo	Gene	Nome do Primer	Sequência do Primer (5'-3')		Tamanho do produto amplificado	Referência
			Senso	Anti-senso		
<i>Babesia</i> sp.	18S rRNA	BAB1	GTGAACCTTATCACTTAAAGG		590 bp	Duarte (15)
	28S rRNA	BAB4	CAACTCCTCCACGCAATCG			
<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>dsb</i>	Dsb-330	GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT		176 bp	Costa (16)
		Dsb-481	TGCTTGTAATGTAGTGCTGCAT			
<i>Hepatozoon</i> spp.	18S rDNA	HEPF	GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC		-	Almeida (17)
		HEPR	ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG			

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 65 animais avaliados na PCR convencional, 1 (1,54%) foi positivo para *Ehrlichia canis* e 3 (4,62%) *Babesia* sp. Com relação a PCR para *Hepatozoon canis*, todos os animais foram negativos, o que difere dos resultados obtidos por Vieira et al. (11) onde *Hepatozoon* sp.

demonstrou-se como o principal agente transmitido por carrapatos no Espírito Santo, estando presente em 10,31% dos casos, enquanto *Babesia vogeli* foi o micro-organismo menos frequente (1,3%). E ao contrário do que foi relatado por Moreira (10) não foi observada coinfeção no presente estudo. Sugere-se que a negatividade de *H. canis* se deva ao fato de tratar-se de agente oportunista e, portanto, dependente de fatores imunossupressores para se liberar da fase tecidual do ciclo, e atingir a circulação sanguínea (18). Salienta-se que no presente estudo, os animais não foram selecionados de acordo com sinais clínicos ou histórico de ectoparasitismo, como realizado nas pesquisas supracitadas, cujos animais eram sintomáticos.

No teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, 6 animais foram negativos (9,23%) sendo 6,15% de Vila Velha e 3,08% de Anchieta e 59 (90,77%) positivos, de Vila Velha 32,31% e de Anchieta, 58,46%, com escores de titulação variados, com 83,08% das amostras com reação de média a forte positiva, conforme demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Resultados da sorologia para *Ehrlichia canis* das amostras de sangue de cães dos municípios de Vila Velha e Anchieta, Espírito Santo – Brasil.

Escore*	Nº de animais	Nº de animais (%)	Vila Velha	Vila Velha (%)	Anchieta	Anchieta (%)
s0	6	9,23%	4	6,15%	2	3,08%
s1	1	1,54%	1	1,54%	0	0%
s2	4	6,15%	1	1,54%	3	4,62%
s3	3	4,62%	2	3,08%	1	1,54%
s4	11	16,92%	2	3,08%	9	13,85%
s4-s5	16	24,62%	6	9,23%	10	15,38%
s5	4	6,15%	0	0%	4	6,15%
s5-s6	17	26,15%	6	9,23%	11	16,92%
≥s6	3	4,62%	3	4,62%	0	0%
Total	65	100%	25	38,46%	40	61,54%

*CombScale do teste ImmunoComb Canine Ehrlichia (Biogal Galed Labs)

Tabela 3. Conversão de títulos e interpretação dos resultados da sorologia para *Ehrlichia canis*.

Escore*	Títulos de Imunofluorescência	Resultado da Reação
s0	0	Reação Negativa
s1	1:20	Reação Fraca Positiva
s2	1:40	Reação Fraca Positiva
s3	1:80	Reação Média Positiva
s4	1:160	Reação Média Positiva
s5	1:320	Reação Forte Positiva
≥s6	1:640	Reação Forte Positiva

*CombScale do teste ImmunoComb Canine Ehrlichia (Biogal Galed Labs)

Apenas um animal positivo na sorologia (1,69% – 1/59), com titulação 160 UI, possuía o gene *dsb* de *E. canis* na PCR e todas as amostras que amplificaram fragmentos dos genes 18S rRNA e 28S rRNA de *B. vogeli* apresentaram títulos 320UI – 640 UI, de anticorpos IgG anti-*Ehrlichia* (5,08% - 3/59).

O resultado obtido na sorologia foi significativamente maior que o encontrado por Spolidorio et al. (19), fato que sugere que os animais tiveram uma exposição prévia à bactéria, não se encontrando na fase de infecção ativa, ou em fase crônica do processo infeccioso, uma vez que títulos elevados de anticorpos podem permanecer por períodos de 6 a 12 meses, o que explica a elevada soroprevalência, comparativamente aos resultados obtidos na PCR (20).

Das amostras avaliadas quanto às alterações hematológicas 32,3% (21/65) apresentavam leucocitose, 27,7% (18/65) trombocitopenia, 18,5% (12/65) anemia e 1,5% (1/65) leucopenia. Os achados hematológicos encontrados nos animais positivos na PCR representaram 11,5% (6/52) do total de alterações, sendo que 50% (2/4) dos animais estavam anêmicos, 75% (3/4) trombocitopênicos e 25% (1/4) com leucocitose. Esses resultados se contrapõem ao encontrado por Valente (21), no qual as alterações de valores de hemograma em animais positivos para um dos agentes foram responsáveis por 65,2% (43/66) dos achados.

Na pesquisa em lâminas de esfregaço sanguíneo não foi possível detectar os hemoparasitas propostos no presente estudo, entretanto foi observado em um animal (1,54%) a presença de corpúsculo intraplaquetário, sugestivo de *Anaplasma platys* e um animal (1,54%) com adesão de cadeia curta basofílica na superfície dos eritrócitos, indicativo de *Mycoplasma haemocanis*, antes denominado *Haemobartonella canis*.

Sugere-se que a baixa ocorrência dos patógenos esteja relacionada a disseminada instituição de tratamento e ao controle efetivo dos vetores na área pesquisada, visto que o Brasil é um país endêmico para esses agentes e que a ocorrência destes está diretamente ligada à presença de carrapatos (1, 22). A terapia é baseada na administração de fármacos derivados de carbanilidas (Dipropionato de imidocarb) e tetraciclina (Doxiciclina) que atuam em infecções causadas por *Ehrlichia canis*, *Babesia* sp., *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys* (22, 23), e são medicamentos utilizados comumente na prática veterinária.

Para melhor definir a prevalência dos agentes transmitidos por carrapatos propõe-se que estudos posteriores contemplem uma amostra populacional maior e que a área analisada seja mais extensa, abrangendo regiões rurais do estado, haja vista que a presença desses micro-organismos é mais relatada nessas áreas se comparada com a área urbana (19). Além de acrescentar outras técnicas, como coleta de sangue periférico de ponta de orelha e esfregaço de capa leucocitária, uma vez que estas aumentam a sensibilidade da pesquisa de hematozoários (24).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a presença de *Ehrlichia canis* e *Babesia* spp. circulantes na população canina da região analisada, e que *Babesia vogeli* foi o agente mais observado na análise molecular. A sensibilidade do teste sorológico para *E. canis* e da pesquisa de hemoparasitas em lâminas de esfregaço sanguíneo foi menor que da PCR, dentre os testes utilizados no estudo. Os resultados encontrados são importantes para conhecimento da distribuição dos agentes em cães naturalmente infectados nos municípios estudados, para que estes possam auxiliar na clínica médica veterinária na obtenção do diagnóstico e determinar o prognóstico do paciente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Vila Velha pelo apoio financeiro, ao professor Daniel Moura de Aguiar e ao Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Little SE. Doenças Transmitidas por Vetores. In Bowman, DD. Parasitologia Veterinária de Georgis. 9a ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2010. p.229-241.

2. Spolidorio MG, Torres MM, Campos WNS, Melo ALT, Igarashi M, Amude AM, Labruna MB, Aguiar DM. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2011;20(3):253-255. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300015>
3. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dash GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2001;51(6):2145-2165. DOI: 10.1099/00207713-51-6-2145
4. Bowman DD. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2010.
5. O'Dwyer LH. *Brazilian canine hepatozoonosis*. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, 2011;20(3):181-193. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300002>
6. Costa HX. Interação de hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia-GO [dissertação]. Goiânia: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás; 2011. <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/852>
7. Kaur N, Singh H, Sharma P, Singh NK, Kashyap N, Singh NK. Development and application of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs. *Acta Tropica*, 2020;212:105713. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105713
8. O'Dwyer LH, Saito ME, Hasegawa MY, Kohayagawa A. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2006;58(4):688-690. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000400039>
9. Paiz LM, Silva RC, Satake F, Fraga TL. Hematological disorders detected in dogs infected by *Hepatozoon canis* in a municipality in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2016;68(5):1187-1194. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8350>
10. Moreira SM. Estudo retrospectivo (1998-2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte: avaliação clínica e laboratorial de infecções experimentais. [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2001. <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-8C8DX2>
11. Vieira FT, Acosta ICL, Martins TF, Filho JM, Krawczak FS, Barbieri ARM, Egert L, Fernandes DR, Braga FR, Labruna MB, Dietze R. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Veterinary parasitology*, 2018;249:43-48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.005>

12. Ramos CA, Ramos RA, Araújo FR, Guedes Junior S, Souza IIF, Ono TM, Vieira AS, Pimentel DS, Rosas EO, Faustino MAG, Alves LC. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. Revista brasileira de parasitologia veterinária, 2009;18:58-62. <https://doi.org/10.4322/rbpv.018e1011>
13. Thrall MA. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. São Paulo: Roca, 2007.
14. Weiser G. Tecnologia Laboratorial em Medicina Veterinária. In: Thrall MA. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2a ed. São Paulo: Roca, 2007. p.33-35.
15. Duarte SC, Linhares GFC, Romanowsky TN, Silveira Neto OJ, Borges LMF. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. Veterinary parasitology, 2008;152(1-2):16-20. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.013
16. Costa JS, Melo ALT, Witter R, Pacheco TA, Chitarra CS, Carvalho ITS, Nakazato L, Dutra V, Pacheco RC, Aguiar DM. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus*(s.l.) ticks in dogs and their domestic environment in Cuiaba, MT, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2019;56(2): e153661-e153661. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.153661>
17. Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, Labruna MB. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). Ticks and tick-borne diseases, 2012; 3(4):203-206. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.02.003
18. Gonen L, Strauss-Ayali D, Shkap V, Vincent-Johnson N, Macintire DK, Baneth G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. Veterinary parasitology, 2004;122(2):131-139. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.03.021
19. Spolidorio MG, Labruna MB, Machado RZ, Moraes-Filho J, Zago AM, Donatele DM, Pinheiro SR, Silveira I, Calieari KM, Yoshinari NH. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2010;83(1):201-206. DOI:10.4269/ajtmh.2010.09-0595
20. Gaunt SD, Beal MJ, Stillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. Parasites & vectors, 2010;3(1):33. <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/33>
21. Valente PCLG. Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais. [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2014. <http://hdl.handle.net/1843/SMOC-9SQFD5>
22. Greay TL, Barbosa AD, Rees RL, Papparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ. An Australian dog diagnosed with an exotic tick-borne infection: should Australia still be considered free from *Hepatozoon canis*? International journal for parasitology, 2018;48(11):805-815. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.05.002>

23. Vial HJ, Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary parasitology*, 2006;138(1-2):147-160. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.048
24. Dória RG, Passarelli D, Chequer TN, Reginato GM, Haysaka YB, Fantinato Neto P, Grigoletto R, Freitas SH. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de esporte e tração (carroceiros). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2016;36(8):724-730. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000800008

Recebido em: 21/07/2021

Aceito em: 15/02/2022