

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES EM CÃES
E GATOS DOMÉSTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jênifer Malheiros Gonçalves

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES EM CÃES E GATOS
DOMÉSTICOS**

Jênifer Malheiros Gonçalves

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES EM CÃES E GATOS
DOMÉSTICOS

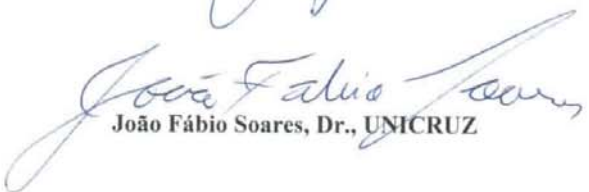
Elaborada por
Jênifer Malheiros Gonçalves

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora


Maria Isabel Botelho Vieira, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)


Luiz Carlos Kreutz, Dr., UPF


João Fábio Soares, Dr., UNICRUZ

Passo Fundo, RS, Brasil
2015

CIP – Catalogação na Publicação

G635a Gonçalves, Jênífer Malheiros
Agentes de doenças transmitidas por vetores em cães e
gatos domésticos / Jênífer Malheiros Gonçalves. – 2015.
71 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015

1. Animais domésticos - Doenças. 2. Gato - Doenças.
3. Cão - Doenças. 4. Zoonoses. I. Vieira, Maria Isabel
Botelho, orientadora. II. Título.

CDU: 636.7/.8

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

“Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.” Salmo 30,12.

Todo e qualquer agradecimento que eu possa fazer, só terá sentido, se reconhecer que Deus, antes de tudo, me escolheu para estar aqui e viver tudo isso. É também necessário reconhecer que, Ele fez com que todas as coisas concorressem para o meu bem, afinal, “todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus” (Romanos 8,28). E isso se deu das mais diversas formas, inclusive, através das pessoas que colocou em meu caminho, as quais irei citar.

Professora e orientadora, Maria Isabel. Obrigada por todas as intruções dadas a mim neste período. Porém, mais que orientar, soube também me conceder sua amizade, o que acaba por contemplar tudo de que precisamos para nos sentirmos bem em um lugar que até pouco, não conhecíamos ninguém.

Aos demais professores do curso. Obrigada pela oportunidade de crescimento profissional. Em minha ânsia de aprender, creio que minhas aspirações foram alcançadas, e caso não tenham sido, com certeza não foi por causa de vocês, afinal, todos se mostraram amantes do conhecimento e felizes com aquilo que ensinavam.

Aos funcionários, médicos veterinários, residentes e estagiários do Hospital Veterinário da UPF. Obrigada a todos que, de alguma forma, me ajudaram na realização de meu projeto. Foram coletas, requisições, exames, cirurgias, etc... Uma série de necessidades que tive durante a realização de meu trabalho e que se tornaram possíveis e mais fáceis na medida em que vocês me ajudaram. Também agradeço ao convívio que tive com todos. Durante este tempo, este hospital foi meu local de trabalho, e vocês, como meus colegas.

Aos colegas. Obrigada pela oportunidade de tê-los comigo. Desejo muito sucesso a vocês.

À UNESP, Jaboticabal. Em meio aos desafios de se fazer uma pós-graduação, tive a oportunidade de conhecer esta Universidade, e, graças a Deus, fui bem acolhida por todas as pessoas que lá conheci. Agradeço em especial aos professores Rosângela Zacarias e Marcos André, que foram essenciais na execução deste trabalho.

À FAPERGS e à CAPES.

Aos meus pais. Não tenho dúvidas de que, uma das maiores formas que Deus usou para me agraciar, foi através da ajuda de meus pais. Todas as conversas, opiniões, despedidas, orações foram traduzidas em incentivo para mim. Obrigada por serem estes anjos em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, obrigada!

Grata a todos!

DEDICATÓRIA

Dedico minha dissertação ao Deus que me trouxe até aqui.

“Portanto, quer comais, quer bebais, ou façais qualquer outra coisa, fazei tudo para a glória de Deus.” I Coríntios 10,31

EPIGRAFE

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito de ciência, nos aproxima.

Louis Pasteur

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 HISTÓRICO	17
2.2 AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES	18
2.2.1 <i>Rangelia vitalii</i>	18
2.2.2 <i>Babesia</i> spp.	19
2.2.3 <i>Hepatozoon</i> spp.	20
2.2.4 <i>Bartonella</i> spp.	20
2.2.5 <i>Anaplasma</i> spp.	21
2.2.6 <i>Ehrlichia</i> spp.	22
2.3 EPIDEMIOLOGIA	23
2.4 DIAGNÓSTICO	25
2.5 CONTROLE E TRATAMENTO	27
3. CAPÍTULO 1	28
Abstract	29
Introduction	30
Material and methods	31
Results	33
Discussion	35
Conclusion	41
References	42
CONCLUSÕES	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	67

LISTA DE FIGURAS

3 CAPÍTULO 1

- FIGURE 1. Parasitic forms of *Rangelia vitalii* intra and extracellular in naturally infected dogs in this study. A and C: piroplasms intraerythrocytic (arrows) (A - Panotic and C - Giemsa). B: extracellular piroplasms (arrow) (Panotic). D: piroplasms within a macrophage (arrow) (Panotic) (1000X)..... 54
- FIGURE 2. Phylogenetic tree of piroplasmids (*Babesia* spp., *Cytauxzoon* sp., *Theileria* spp. and *Rangelia vitalii*) (18S rRNA) based on and maximum likelihood, using a GTRGAMMA model of evolution. Numbers correspond to bootstrap values over 50. **Samples from the present study..... 55
- FIGURE 3. Phylogenetic tree of *Hepatozoon* spp. (18S rRNA) based on and maximum likelihood, using a GTRGAMMA model of evolution. Numbers correspond to bootstrap values over 50. **Samples from the present study..... 56
- FIGURE 4. Phylogenetic tree of *Anaplasma* spp. (16S rRNA) based on and maximum likelihood, using a GTRGAMMA model of evolution. Numbers correspond to bootstrap values over 50. **Samples from the present study..... 57

APÊNDICES - DISSERTAÇÃO

- FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 1%. nPCR do gene 18S rRNA de *Babesia* spp. CP de *B. canis* obtido através de cão experimentalmente infectado. CN com água ultra-pura esterilizada. A: amostras 73, 86, 94, 96, 100, 102 e 108* positivas. B: amostras 98, 106, 107, 108, 109 e 110 positivas. As demais amostras foram todas negativas. pb: Pares de Base. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo. *Amostra 108 foi repetida..... 69
- FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose 1%. PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. CP de *Hepatozoon* spp. obtido de canídeo selvagem naturalmente infectado. CN com água ultra-pura esterilizada. Amostras 69, 70 e 71 positivas, porém somente a amostra 69 foi possível ser sequenciada. As demais amostras foram todas negativas. pb: Pares de Base. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo..... 70
- FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose 1%. nPCR do gene 16S rRNA de *Anaplasma* spp. CP de *Anaplasma* spp. obtido de cão naturalmente infectado. CN com água ultra-pura esterilizada. Amostra 52 positiva. Amostra 53 negativa. pb: Pares de base. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo..... 71
- FIGURE 4. Sinais clínicos de cães naturalmente infectados neste estudo positivos para *R. vitalii*. A: Hemorragia nasal. B: Hemorragia auricular. C: Mucosa oral pálida. D: Mucosa ocular ictérica. *As quatro imagens correspondem a quatro diferentes animais infectados..... 72

LISTA DE TABELAS**3 CAPÍTULO 1**

TABELA 1.	Primer sets for PCR amplification of VBD agents.....	52
TABELA 2.	Results of the blood smear, ELISA and PCR according to the type of procedure.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Anticorpos
bp	Pares de Base
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CSD	Cat Scratch Disease
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dsb	Double-strand break
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMC	Ehrlichiose Monocítica Canina
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HV-UPF	Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo
IF	Imunofluorescência
IFI	Imunofluorescência indireta
µL	Microlitros
MT	Mato Grosso
MS	Mato Grosso do Sul
NTD	Neglected Tropical Diseases
nuoG	NADH dehydrogenase gamma subunit
OD	Optical Density
OMS	Organização Mundial de Saúde
PR	Paraná
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
16S rRNA	Subunidade menor do Ácido Ribonucleico Ribossomico
18S rRNA	Subunidade menor do Ácido Ribonucleico Ribossomico
RS	Rio Grande do Sul
RJ	Rio de Janeiro
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo
UPF	Universidade de Passo Fundo
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VBD	Vector-Borne Disease

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES EM CÃES E GATOS DOMÉSTICOS

Autora: Jênifer Malheiros Gonçalves
Orientadora: Maria Isabel Botelho Vieira
Passo Fundo, 31 de julho de 2015.

O presente trabalho relata a ocorrência dos agentes de doenças transmitidas por vetores (VBD) *Rangelia vitalii*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon* spp., *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp. em cães e gatos domésticos. A presença destes vetores, carrapatos e pulgas, confere a distribuição em larga escala das doenças zoonóticas no mundo, que por sua vez, ganharam destaque no ano de 2014 pela Organização Mundial de Saúde (OMS). As doenças transmitidas por vetores podem ser consideradas emergentes ou re-emergentes e, em certas regiões, sua epidemiologia ainda não está definida. Portanto, este estudo objetivou identificar agentes de doenças transmitidas por vetores causadores de hemoparasitoses em cães e gatos domésticos. Amostras de sangue periférico e de ponta de orelha foram colhidas de 110 animais, compreendendo 80 cães e 30 gatos. Os animais eram provenientes dos atendimentos de rotina e de cirurgias de esterilização do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (HV-UPF), cidade de Passo Fundo, região Noroeste do RS. As amostras dos cães foram submetidas a esfregaço sanguíneo coradas com Giemsa e Panótico, detecção de anticorpos anti-*Babesia vogeli* e anti-*Ehrlichia canis* através do método de ELISA e PCR para *Babesia* spp. (gene 18S rRNA), *Hepatozoon* spp. (gene 18S rRNA), *Anaplasma* spp. (gene 16S rRNA) e *Ehrlichia* spp. (gene dsb). As amostras de gatos foram submetidas apenas a esfregaço sanguíneo e PCR para *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Bartonella* spp (gene nuoG), *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. (gene 16S rRNA). Os esfregaços sanguíneos revelaram um total de 20% (22/110) de amostras positivas, sendo 63,63% (14/22) e 9,09% (2/22) apresentando estruturas semelhantes a mórulas em plaquetas e monócitos, respectivamente. Estruturas compatíveis com piroplasmas foram encontradas em 27,27% (6/22). Os demais agentes não foram identificados por estes métodos. Somente os animais infectados com *R. vitalii* apresentaram alterações clínicas e hematológicas compatíveis com rangeliase, cujas alterações mais frequentes foram anemia (100%), trombocitopenia (66,7%), icterícia, hemorragias externas e anorexia (50%). Os demais animais positivos identificados com os demais agentes não apresentaram sinais clínicos e/ou alterações hematológicas compatíveis com a infecção causada pelos mesmos. A pesquisa de anticorpos contra *B. vogeli* mostrou soropositividade de 91% (73/80), enquanto que para *B. vogeli* e *E. canis*, apenas 8,75% (7/80). Dezenove (17,27%) dos 110 animais amostrados foram positivos para algum tipo de hemoparasita na PCR. Onze (10%) foram positivos para o gene 18S rRNA de *Babesia* spp., e após sequenciamento genético identificou-se o agente *R. vitalii* em 6 (5,5%) dos cães e *B. vogeli* em 3 cães (2,72%) e 2 gatos (1,81%). Para o gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.

apenas um cão (0,9%) foi positivo, assim como também apenas um cão (0,9%) foi positivo para o gene 16S rRNA de *Anaplasma* spp. Para o gene nuoG de *Bartonella* spp., 6 gatos (20%) foram positivos. Nenhuma amostra foi positiva para os genes dsb e 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. Neste estudo reportamos pela primeira vez no Estado do RS a confirmação molecular de *B. vogeli* em cães e gatos domésticos. Ademais, os agentes *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. e *Bartonella* spp. ainda não haviam sido descritos na região do presente estudo. E, além disso, nós sugerimos que *R. vitalii* é um dos agentes transmitidos por vetores mais frequentes no Estado do RS.

Palavras-chave: animais domésticos, doenças vetoriais, carrapatos, pulgas, zoonoses, diagnóstico.

ABSTRACT**Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo****VECTOR-BORNE DISEASES AGENTS IN DOMESTIC DOGS AND CATS**

Author: Jênifer Malheiros Gonçalves

Advisor: Maria Isabel Botelho Vieira

Passo Fundo, July 31 2015

This study reports the occurrence of vector-borne diseases (VBD) agents *Rangelia vitalii*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. e *Bartonella* spp. in domestic dogs and cats. The presence of these vectors, ticks and fleas, gives large-scale distribution of vector-borne diseases in the world, which in turn, have gained prominence in 2014 by the World Health Organization (WHO). The vector-borne diseases can be considered emerging or re-emerging and, in certain regions, its epidemiology is not yet defined. Therefore, this study aimed to identify vector-borne diseases agents by causing hemoparasitosis in domestic dogs and cats. Peripheral blood samples and ear tip were harvested from 110 animals, comprising 80 dogs and 30 cats. The animals were from the routine care and sterilization surgeries Veterinary Hospital of the University of Passo Fundo (HV-UPF), the city of Passo Fundo, Northwest, RS. The samples of dogs underwent blood smear by Giemsa and the Panotic staining, detection of anti-*Babesia vogeli* antibodies and anti-*Ehrlichia canis* by ELISA and PCR method for *Babesia* spp. (18S rRNA gene), *Hepatozoon* spp. (18S rRNA gene), *Anaplasma* spp. (16S rRNA) and *Ehrlichia* spp. (dsb gene). Blood smears revealed a total of 20% (22/110) of positive samples, and 63.63% (14/22) and 9.09% (2/22) having structures similar to morulae platelet and monocytes, respectively. Structures compatible with piroplasms were found in 27.27% (6/22). The other agents were not identified by these methods. Only animals infected with *R. vitalii* presented clinical and hematological alterations compatible with rangeliase, whose most common were anemia (100%), thrombocytopenia (66.7%), jaundice, external bleeding and anorexia (50%). The other positive animals identified with the other agents did not show clinical signs and/or hematological alterations compatible with infection caused by them. The detection of antibodies against *B. vogeli* showed seropositivity of 91% (73/80), while for *B. vogeli* and *E. canis*, only 8.75% (7/80). Nineteen (17.27%) of the 110 animals sampled were positive for some kind of hemoparasite in PCR. Eleven (10%) were positive for the 18S rRNA gene of *Babesia* spp., and after genetic sequencing identified the agent *R. vitalii* in 6 (5.5%) of dogs and *B. vogeli* in 3 dogs (2.72%) and 2 cats (1.81%). For the 18S rRNA gene *Hepatozoon* spp. only one dog was positive, as well as only one dogs (0.9%) were positive for 16S rRNA gene of *Anaplasma* spp. For nuoG gene *Bartonella* spp., 6 cats (20%) were positive. No sample was positive for dsb and 16S rRNA genes of *Ehrlichia* spp. In this study we report for the first time in the state of RS the molecular confirmation of *B. vogeli* in domestic dogs and cats. In addition, agents *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. and *Bartonella* spp. had not yet been described in the

present study area. Furthermore, we suggest that *R. vitalii* is one of the most common vector-borne agents in RS.

Keywords: domestic animals, vector-borne diseases, ticks, fleas, zoonosis, diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores são reconhecidas como importantes doenças emergentes. Elas constituem um grave problema em saúde pública, visto que, algumas delas podem afetar tanto o homem como os animais domésticos e selvagens (1,2,3). *Rangelia vitalii* (4), *Babesia* spp. (5), *Hepatozoon* spp. (6), *Bartonella* spp. (7,8), *Anaplasma* spp. (9), *Ehrlichia* spp. (10), têm surgido como importantes patógenos de pequenos animais (7,8,9). Além disso, cães e gatos desempenham um importante papel no ciclo de muitos agentes transmitidos por vetores, agindo com reservatórios, hospedeiros ou sentinelas (11).

O protozoário *R. vitalii*, causador da rangelirose (“nambiuvú”), até o momento, ocorre somente na América do Sul, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (12,13,14,15). Esta doença ficou por mais de 50 anos esquecida pelo mundo acadêmico e por pesquisadores, e nesta última década tem despertado o interesse de alguns grupos no país, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul (RS) (15) onde a rangelirose parece ser mais frequente (4), porém, com poucos relatos publicados.

A babesiose vem acometendo animais domésticos e selvagens desde o século 19. Após seus primeiros relatos, mais de 100 espécies já foram descritas e encontradas em todo o mundo (16,5). No Brasil, as espécies reportadas são em cães são *Babesia canis vogeli* e *Babesia gibsoni* (17,18,19). Existe um notável impacto das infecções por *Babesia* em animais domésticos, seres humanos e, mais recentemente, animais selvagens, o que tem feito com que mais pesquisas sejam realizadas (5).

Hepatozoonose em cães é uma infecção comum no Velho Mundo. A espécie *Hepatozoon canis* é amplamente encontrada na Ásia, Europa, África, mas também na América Latina (20,21), incluindo no Brasil, cuja espécie é a única relatada (21).

Bartonella spp. são bactérias que causam doenças consideradas endêmicas em seres humanos em alguns países da América do Sul (22,23,24). Nos últimos 20 anos, muitas espécies e subespécies de *Bartonella* foram descobertas. Das 23 espécies reconhecidas no gênero, 13 delas já foram relatadas como causadoras de doenças em humanos e seis têm sido isoladas de gatos domésticos (8).

As erliquioses ocorrem em vários lugares do mundo, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, como na América do Sul (25,26), cujas áreas são próximas às que possuem a distribuição de seus vetores (25). No caso das anaplasmoses, as principais espécies envolvidas em infecções de cães são *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*

(11,27). *Ehrlichia canis*, causadora da erliquiose monocítica canina (EMC), é um dos patógenos mais comuns que infecta cães domésticos em todo o mundo (10).

Este estudo objetivou identificar a ocorrência de agentes de doenças transmitidas por vetores causadores de hemoparasitoses em cães e gatos domésticos. Verificaram-se as alterações clínicas e hematológicas mais comuns nos animais infectados. Além disso, determinou-se a frequência de animais positivos no atendimento eletivo e nos animais atendidos pela rotina do HV-UPF, que apresentavam sinais clínicos e/ou hematológicos compatíveis com hemoparasitoses.

Esta pesquisa vem ao encontro das necessidades de respostas frente à epidemiologia das doenças transmitidas por vetores, pois estas possuem um caráter dinâmico, visto que estão em constantes transformações. As mesmas são afetadas principalmente pela mudança de comportamento dos seres humanos, no que diz respeito ao seu relacionamento com animais domésticos, além de mudanças climáticas, que por sua vez, ampliam a distribuição geográfica de vetores, o que afeta diretamente a epidemiologia dessas doenças, pois onde estão os seus vetores, aí também poderão estar seus agentes infecciosos.

Ainda são poucos os estudos de prevalência sobre algumas doenças transmitidas por vetores, e a ocorrência delas pode estar sendo subestimada no Brasil e no mundo, tanto na área veterinária, quanto na humana. Este fato pode ser atribuído à falta de interesse por parte dos pesquisadores e diagnósticos errôneos devido, em alguns casos, à falta de experiência técnica. Para tanto, estudos que investigam quais são os agentes causadores de doenças em pequenos animais, e quais os vetores relacionados à transmissão destes, colaboram com diagnósticos e tratamentos mais confiáveis, além de diminuir a chance de possíveis resistências aos fármacos no futuro. Com isso, diagnóstico e vigilância epidemiológica associados poderão desencadear medidas de prevenção que contribuam para a saúde humana e veterinária.

Esta dissertação compreende, além da introdução, a revisão de literatura sobre as doenças transmitidas por vetores e seus agentes, epidemiologia, diagnóstico, controle e tratamento e um capítulo na forma de artigo científico. O artigo “**Vector-borne diseases agents in domestic dogs and cats from Southern Brazil**” relata a ocorrência de agentes de doenças transmitidas por vetores encontrados em cães e gatos domésticos e foi submetido ao periódico *Ticks and Tick-Borne Diseases*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O protozoário *Rangelia vitalii* foi referenciado pela primeira vez em 1908 através do artigo publicado por Antonio Carini. No artigo, Carini afirmara que o “nambi-uvú” de cães (rangeliase canina), seria similar à babesiose canina (28). Mais tarde, em 1910, Pestana (29) publicou um artigo relatando que o “nambi-uvú” seria causado por um piroplasma desconhecido, que então foi nomeado por ele de *Piroplasma vitalii*. Em 1914, Carini e Maciel (30) sugerem que o nome científico do parasita deveria ser *Rangelia vitalii*, devido ao seu primeiro observador, Rangel Pestana. Porém, houve descrença por parte de alguns cientistas sobre *R. vitalii* ser mesmo um novo piroplasma, e de 1985 a 1993, este protozoário foi erroneamente diagnosticado como *Leishmania*. Além disso, os cientistas acreditavam que os achados no sangue dos animais relatados por Pestana, eram na realidade casos de babesiose, e as estruturas encontradas nos tecidos, eles acreditavam ser de *Toxoplasma* (31,32).

O protozoário *Babesia* spp. foi identificado pela primeira vez, no final do século 19, por Victor Babes, que encontrou micro-organismos no interior de eritrócitos de ruminantes na Romênia. Os animais em questão apresentavam hemoglobinúria e febre. Mais tarde, os micro-organismos foram nomeados de *B. bovis* (16,5). Nos animais domésticos, a babesiose foi descrita por volta de 1895, quando Piana e Galli-Valerio nomearam agentes que parasitavam os eritrócitos de cães de *B. canis* (33).

As espécies do gênero *Hepatozoon* foram inicialmente descritas na Índia em 1905, porém, receberam o nome de *Leukocytozoon canis*. Somente alguns anos depois o nome *Hepatozoon* passou a descrever este gênero (34).

As enfermidades causadas por *Bartonella* spp. possuem descrições a mais de mil anos. *Bartonella bacilliformis* é relatada como possível causadora da queda do Império Inca e, atualmente, é endêmica na América do Sul. Já *Bartonella quintana* foi detectada 400 anos depois em tecidos provenientes da região Sudeste da França e em restos mortais de soldados de Napoleão Bonaparte em Vilnius, Lithuania. Mais tarde, em 1990, identificou-se *B. hanselae* como agente causador da angiomatose bacilar (35).

As espécies do gênero *Anaplasma* que infectam cães foram previamente descritas como pertencentes ao gênero *Ehrlichia* (36). As infecções por *Anaplasma platys* foram descritas pela primeira vez em 1978, e por *Anaplasma phagocytophilum*, em 1996, ambas nos EUA (37,38). As rickétsias transmitidas por carrapatos estão aumentando, e têm se tornado uma ameaça aos seres humanos e aos animais (39).

Ehrlichia canis, agente causador da EMC, foi descrita pela primeira vez em 1935 na Argélia por Donatyen e Lestoquard, após, em 1970, na Guerra do Vietna, erliquiose foi considerada como doença de cães ao levar a óbito cães da raça pastor alemão de soldados da guerra (40). Atualmente, as erliquioses são consideradas doenças emergentes de homens e animais (41).

Na atualidade, é tamanha a importância destas doenças em todo o mundo, que no ano de 2014, a Organização Mundial de Saúde dedicou o Dia Mundial da Saúde 2014 ao tema das Doenças Transmitidas por Vetores, com o *slogan* “Pequena picada, grande ameaça” (3,42).

2.2 AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES

As hemoparasitoses são doenças transmitidas por vetores (carrapatos, pulgas, mosquitos, flebotomíneos e piolhos), e têm se expandido por diferentes regiões do mundo por fatores diversos que incluem desde mudanças no comportamento humano até modificações ecológicas (1,42). As doenças transmitidas por vetores constituem uma variedade de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Dentre estes patógenos, muitos podem ser considerados agentes emergentes ou re-emergentes e alguns possuem caráter zoonótico (2).

Muitos hemoparasitas são transmitidos através de vetores para cães e gatos domésticos, incluindo protozoários e bactérias, tais como *Babesia* spp., *R. vitalii*, *Cytauxzoon felis*, *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp. entre outros (43).

2.2.1 *Rangelia vitalii*

R. vitalii é um protozoário intracelular pertencente ao filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (17). Este protozoário infecta principalmente cães jovens e acredita-se que sua transmissão se dá através dos carrapatos ixodídeos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.)*, cuja transmissão ocorre de forma transtádial, ou seja, de ninfas para adultos (12,44,46).

Mesmo tendo sido descrito em 1910, o parasita *R. vitalii* ainda é pouco caracterizado (12,46). Existem muitas controvérsias e poucas informações relacionadas ao seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados e invertebrados (12,47), além disso, muitas confusões com outros protozoários e riquetsias ocorrem no sangue e tecido de caninos (47). Até o momento, seu ciclo se resume em achados de formas parasitárias em cães domésticos no interior de

eritrócitos, leucócitos (monócitos e neutrófilos), células endoteliais na forma de vacúolos parasitóforos e de forma livre no plasma (12,44,45).

A doença, também chamada de “nambyuvú”, “peste do sangue”, “febre amarela dos cães”, é considerada um distúrbio hemolítico e hemorrágico imunomediado (4,32). Nos cães, icterícia e anemia parecem ser achados comuns. Além disso, febre, apatia, perda de peso, desidratação, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia e petéquias nas mucosas são alguns dos demais sintomas. Sangramentos nas narinas, olhos e mucosa oral são considerados sinais clínicos típicos de rangeliose (12,45). As alterações hematológicas mais frequentes compreendem anemia macrocítica e hipocrômica, ou ainda, normocítica e normocrômica, podendo ocorrer regeneração eritróide (4,12,47). No leucograma é possível encontrar linfocitose, neutrofilia e monocitose. O número de plaquetas pode diminuir e pode-se encontrar macroplaquetas (12,47).

Como já ocorreu no passado, rangeliose e babesiose podem ser confundidas, pois os achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos são semelhantes, porém a hemólise causada por *R. vitalii* é do tipo extravascular, enquanto que a causada por *Babesia* spp. é do tipo intravascular. Além disso, *Babesia* spp. não infecta os tecidos, já *R. vitalii* sim (4).

2.2.2 *Babesia* spp.

O gênero *Babesia* é composto por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (16,48). Até o momento, cerca de 100 espécies são reconhecidas dentro do gênero *Babesia* (5). Infectam os eritrócitos de uma variedade de animais domésticos e selvagens, incluindo o homem (48,5,49,50).

As espécies de *Babesia* capazes de infectar os cães compreendem *Babesia* sp., *B. conradae*, *B. gibsoni* e *B. canis*, com as subespécies *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* e *B. canis canis* (16,48). Além destas, outras já foram descritas, porém, algumas somente foram identificadas através de técnicas moleculares (51). A transmissão das espécies ocorre através da picada de carrapatos contaminados, no entanto, estudos mostram suspeitas de que *B. gibsoni* também pode ser transmitida de cão para cão através da mordedura de feridas, saliva ou ingestão de sangue (16). Os vetores variam de acordo com a espécie/subespécie envolvida (48), como no caso de *B. vogeli*, cuja transmissão se dá pelo carrapato *R. sanguineus s.l.* e *B. gibsoni*, transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis longicornis* (5,52). Já os gatos podem ser infectados pelas espécies *B. felis*, *B. catis* e, até mesmo, *B. vogeli*, porém, para esta espécie, os casos clínicos ainda não foram relatados, apenas a detecção de material genético (5,16,49).

A babesiose canina, causada pela subsespécies *B. vogeli*, é considerada de grau leve, e normalmente, é subclínica em cães adultos, porém pode ser fatal em filhotes (5,16). Os sinais clínicos compreendidos na doença são febre, palidez, icterícia, esplenomegalia, fraqueza e colapso associado com hemólise intra e extravascular, lesão hipóxica, inflamação sistêmica, trombocitopenia e pigmentúria (52). A babesiose felina apresenta raros sinais clínicos quando comparados aos da babesiose canina (16).

2.2.3 *Hepatozoon spp.*

Hepatozoon spp. são protozoários do Filo Apicomplexa, família Hepatozoidae, que infectam animais domésticos, carnívoros selvagens, pássaros, répteis e anfíbios (6,21,53). Em relação à infecção em hospedeiros humanos, o potencial zoonótico de *Hepatozoon* parece ser ignorado (27). Existem mais de 300 espécies de *Hepatozoon*, e destas, 46 infectam mamíferos (6). As duas espécies que infectam cães são *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* (10,54), e os gatos, a espécie reconhecida é *H. felis* (53).

R. sanguineus s.l. é o principal vetor de *H. canis* em cães no Velho Mundo (20,54), porém, no Brasil, alguns autores sugerem que outras espécies de carrapatos possam transmitir (55). Ao ingerir carrapatos contaminados (21,53,54), ou partes deles (21), direta ou indiretamente através de presas (53,56), o animal acaba por infectar-se com oocistos contendo as formas infectantes do protozoário (58). Acredita-se que a transmissão de forma vertical ocorra, assim como ocorre com a espécie *H. americanum* (56).

A infecção por *H. canis* ocorre em órgãos do sistema reticuloendotelial como baço, linfonodos e medula óssea. Os sinais clínicos encontrados são letargia, anemia (6,54), rigidez, dor, perda de peso e febre. Os achados hematológicos incluem aumento no número de leucócitos. A doença tende a ser crônica e leve. Porém, quando existe alta carga parasitária, ela pode ser fatal (6).

2.2.4 *Bartonella spp.*

Bartonella spp. são bactérias gram-negativas, fastidiosas, intracelulares. Estas bactérias infectam seres humanos e têm sido identificadas com abrangência em animais domésticos, como gatos, e também animais selvagens (57,58,59). A transmissão de *Bartonella spp.* irá depender da espécie envolvida, onde pulgas, flebotomíneos e piolhos são os vetores mais encontrados. Sabe-se que a transmissão para os felinos ocorre através de pulgas

(*Ctenocephalides felis*), porém outros potenciais vetores já foram relatados, como carrapatos e moscas, por portarem DNA de *Bartonella* (57,58,60).

Nos gatos, *Bartonella* infecta células endoteliais e eritrócitos, e estes últimos, por sua vez, são ingeridos por pulgas. Nestas, a bactéria sobrevive nas glândulas salivares. Fezes de pulgas contaminadas com a bactéria podem ser depositadas sobre a pele dos gatos e isso pode levá-los a se coçar. Deste modo, a arranhadura dos gatos confere um modo comum de transmissão para outros animais, inclusive para o homem (60). As infecções por *Bartonella* variam de auto-limitadas até graves, e podem envolver diferentes órgãos (7). Porém, gatos naturalmente infectados, raramente desenvolvem sinais clínicos (61).

As bartoneloses constituem um grupo de patógenos responsáveis por zoonoses bacterianas emergentes (62), além disso, as bartoneloses causadas por *Bartonella henselae* são consideradas, em algumas partes do mundo, Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD= Neglected Tropical Diseases) (63). Doença da arranhadura do gato (CSD), doença de Carrión, febre das trincheiras, angiomatose bacilar e endocardites são as principais doenças causadas por bactérias deste gênero (62).

Nos últimos 20 anos, muitas espécies e subespécies de *Bartonella* foram descobertas. Mamíferos como gatos, cães, ruminantes e roedores podem ser infectados com espécies de *Bartonella* e desenvolver doença, ou ainda, podem ser assintomáticos e servirem como reservatórios para infecções zoonóticas (35). Treze espécies são suspeitas de causar doença em humanos e seis delas em felinos domésticos. Dos agentes relacionados aos felinos domésticos, as seguintes espécies são relatadas: *B. henselae* (CSD e angiomatose bacilar), *B. clarridgeiae* (nenhuma patologia associada), *B. koehlerae* (endocardite), *B. bovis*, *B. vinsoni berkhoffii* e *B. quintanna* (febre das trincheiras), sendo estas três últimas recentemente isoladas em gatos (8,57).

2.2.5 *Anaplasma* spp.

As bactérias que pertencem ao gênero *Anaplasma* são gram negativas intracelulares obrigatórias e infectam células do sangue de mamíferos. Os vertebrados constituem o principal reservatório desta riquétsia. Elas podem causar doença em animais domésticos e em seres humanos (25).

A. phagocytophilum e *A. platys* podem infectar uma série de vertebrados selvagens e domésticos, incluindo cães e gatos (11,56). *A. phagocytophilum* é transmitida pelo carrapato do gênero *Ixodes* em diversas partes do mundo, porém no Brasil, evidências apontam que a

transmissão desta bactéria seja por *Amblyomma cajennense* e *R. sanguineus s.l.* (64). A infecção ocorre em neutrófilos e a doença é conhecida como anaplasmose granulocítica canina (11). A doença pode causar febre, anorexia, dor, neutropenia e trombocitopenia (36).

A. platys parece ser transmitida pelo carrapato *R. sanguineus s.l.* (11,66), porém, no Brasil, dados epidemiológicos também sugerem a transmissão por *A. cajennense* (65). Infecta plaquetas, causa destruição das mesmas (26) e trombocitopenia cíclica em cães (54,65,66). Além disso, estudos recentes indicam que *A. platys* também pode infectar megacariócitos e promegacariócitos (65,67). Geralmente, as infecções causadas por *A. platys* são subclínicas. Porém, quando existem sinais clínicos, estes compreendem linfadenomegalia e mucosas pálidas (9,66). A virulência de *A. platys* é considerada baixa. Sua importância se dá principalmente quando encontrada associada a outro agente (66), como por exemplo *E. canis* (54,65,68,69), devido ao fato de que ambas parecem possuir o mesmo vetor, *R. sanguineus s.l.* (54,68).

2.2.6 Ehrlichia spp.

O gênero *Ehrlichia* pertence à Ordem Rickettsiales e à família Anaplasmataceae. Compreende seis espécies reconhecidas através da análise da sequência do 16S rRNA, correspondendo à *E. canis* (cães e seres humanos), *E. chaffensis* (cães e seres humanos), *E. ewingii* (cães e seres humanos), *E. muris* (roedores) e *E. ruminantium* (ruminantes), *E. mineirensis* (70,71,95). *E. canis*, que é um patógeno comum de cães domésticos no mundo todo, é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória que infecta monócitos (68,70).

E. canis é o agente causal da EMC, cuja transmissão ocorre por meio do carrapato *R. sanguineus s.l.* (68). Estágios imaturos de *R. sanguineus s.l.* são infectados quando alimentam-se de um cão rickettsêmico e, em seguida, mantem a infecção transestadialmente, permitindo a transmissão para outro animal quando o carrapato se alimenta novamente como uma ninfa ou um adulto. Carrapatos adultos também têm mostrado ser capazes de transmitir *E. canis* intraestadialmente, um percurso que pode ser importante em situações de surto (71).

Esta enfermidade foi relatada nos EUA e se disseminou para o mundo, causando extensiva morbidade e mortalidade (10). As alterações clínicas e laboratoriais encontradas compreendem febre, letargia, claudicação, corrimento ocular e nasal, trombocitopenia, anemia não regenerativa, leucopenia, hiperglobulinemia e proteinúria durante as várias etapas de infecção (68).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Humanos e animais pertencentes a regiões tropicais e subtropicais, ainda hoje, continuam a sofrer os agravos das doenças parasitárias (17). Os agentes transmitidos por vetores têm surgido em novas regiões geográficas, enquanto muitas doenças endêmicas têm aumentado a sua incidência. Muitos agentes que são considerados endêmicos estão se dispersando em escala local, coincidindo com as mudanças observadas em seu habitat natural. A emergência local é impulsionada também por alterações de fatores humanos e pela especialização de ciclos enzoóticos. O aumento do tráfego de pessoas e bens, em alturas em que as condições são adequadas, contribui com a introdução de novos agentes infecciosos e sua proliferação (3,42). Além disso, co-infecções com *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Leishmania* e *Rickettsia* podem ocorrer em áreas endêmicas (41).

Após ser negligenciada por mais de 50 anos, a rangelirose é considerada uma doença re-emergente no Brasil (15), e até o presente, com relatos de ocorrência apenas na Argentina e no Uruguai (12,13,14). No Brasil, *R. vitalii* afeta principalmente cães jovens pertencentes a zonas urbanas, rurais e cães de caça. Na realidade, sua distribuição está associada aos locais onde se encontra os seus possíveis vetores. *A. aureolatum* (“carrapato amarelo do cão”) e *R. sanguineus s.l.* (“carrapato vermelho do cão”) são encontrados quando da infecção de cães por *R. vitalii* (47).

Os casos de rangelirose no Brasil se concentram nas regiões Sul e Sudeste, com descrições nos Estados do Rio de Janeiro (RJ) (44), São Paulo (SP) (28,29) e Rio Grande do Sul (RS) (4,72). No RS, onde a doença parece ser mais comum, um estudo retrospectivo de Figuera et al. (4) identificou 35 casos de infecção por *R. vitalii* em exames de necropsia e histopatologia de amostras dos anos de 1985 a 2009. No estudo de Lemos et al. (44), de 103 cães atendidos em uma clínica veterinária do Estado do RJ no período de 2006 a 2008, seis casos foram positivos para *R. vitalii* através de PCR-RFLP. Para além das regiões citadas, apenas um relato de rangelirose foi descrito em 2013 por Moreira et al. (73) no estado de Minas Gerais. No entanto, existem poucos estudos de prevalência sobre a doença no Brasil.

No mundo, a importância das infecções por *Babesia* são, primeiramente, na área veterinária, contudo, casos em seres humanos, principalmente, na Europa e na América do Norte, levantam a hipótese de estas serem consideradas doenças emergentes (50). Entretanto, é notável o impacto que as infecções por *Babesia* causam em animais domésticos, seres humanos e, mais recentemente, animais selvagens, o que tem feito com que mais pesquisas sejam realizadas (5).

O gênero *Babesia* possui seus relatos provenientes dos cinco continentes, no entanto, sua distribuição é variada nas diferentes regiões (5,16). As espécies de *B. vogeli* já foram relatadas na África, na Ásia, na Europa, nas Américas e na Austrália. No Brasil, *B. vogeli* e *B. gibsoni* são as únicas subespécie e espécie relatadas até o momento (17,18,19), no entanto, o carrapato transmissor de *B. gibsoni* ainda não foi encontrado no país (19). Já a babesiose felina, cujas primeiras descrições foram feitas na África do Sul (49), continua sendo amplamente encontrada no país (18). Além deste, vários outros países já relataram babesiose felina, não somente em gatos domésticos, como também em felinos selvagens (49,74,75,76).

Globalmente, a prevalência de *H. canis* em cães gira em torno de 0.9% a 71% (77). Hepatozoonose em cães é uma infecção comum no Velho Mundo. A espécie *H. canis* é amplamente encontrada na Ásia, Europa, África, mas também na América Latina (6,20,21), incluindo no Brasil, cuja espécie é a única relatada (21). No continente europeu, relatos de hepatozoonose em cães já ocorreram na Croácia, Itália, Bulgária e Grécia (21). Em Portugal, *H. canis* já foi detectado do Sul ao Norte do país (11). A prevalência da infecção no Brasil é variada, com estudos que apontam níveis em torno de 58% (78) e 67% (79), até níveis mais altos, como 84,3% em cães de zona rural da região Sudeste do país (80).

As espécies de *Bartonella* estão distribuídas amplamente por todo o mundo. Sua prevalência é maior principalmente em áreas onde existem condições favoráveis aos seus vetores (43).

Estudos sorológicos realizados em gatos de países da Europa indicam soropositividade de 8-53% para *Bartonella*, deixando claro que bartoneloses são comuns neste continente (43). Na América do Sul, a espécie *B. henselae* é endêmica nos Andes (Peru). Causadora de doença desde o tempo dos Incas, a Doença de Carrión foi descrita apenas na região Andina, além do Equador e da Colômbia (22,23,24). No Brasil, alguns estudos de prevalência em gatos foram realizados no RJ, SP e RS (59,81). O primeiro estudo molecular ocorreu no RJ em 2010, cuja frequência de *Bartonella* pôde ser considerada elevada frente a outros achados. Neste estudo, Souza et al. (81) encontraram uma prevalência de *Bartonella* spp de 97,3%. No RS, o estudo de Staggemeier et al. (59), mostrou positividade para espécies de *Bartonella* em oito de 47 amostras de gatos domésticos da cidade de Novo Hamburgo. Contudo, não existem outros dados relacionados ao agente *Bartonella* spp em felinos domésticos no Brasil (59).

As erliquioses ocorrem em vários lugares do mundo, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, como na América do Sul (25,26), cujas áreas são próximas às que possuem a distribuição de seus vetores (25).

Estudos de soroprevalência revelam soropositividade para *Anaplasma* de 17-50% em cães na Europa (36). Segundo Beugnet et al. (82), nos últimos dez anos várias doenças têm sido relatadas nos animais, como nos cães, incluindo anaplasmoses causada por *A. platys* na França e anaplasmoses causada por *A. phagocytophilum* no norte da Europa. Na América do Sul, a pesquisa de ehrlichiose foi realizada em 30 cães pertencentes à cidade de Santiago, no Chile. Destes, seis foram positivos na PCR para *A. platys*. Além disso, o achado reforça a ideia de que o carrapato *R. sanguineus s.l.* seja o transmissor desta rickettsia, pois ele é o único carrapato encontrado parasitando cães em Santiago (83). Por outro lado, no Brasil não existem dados sorológicos, somente moleculares, que revelam 7,8 a 88% de casos positivos para *A. platys*. Já para *A. phagocytophilum*, os relatos são bem restritos e envolvem detecção por PCR em tempo real em cães (64).

As erliquioses causadas pelas espécies de *Ehrlichia* são consideradas doenças emergentes e afetam cães em muitas partes do mundo (9). Nos Estados Unidos, cães da região sudeste do país possuem uma das mais altas soroprevalências para *Ehrlichia* spp., e estes dados são concordantes com o aumento das doenças causadas por estas bactérias em seres humanos (84). No Brasil, estudos sorológicos para detecção de anticorpos contra *E. canis* no soro de cães já foram realizados em, praticamente, todo o território brasileiro, e seus níveis variam de 0,7 a 92% nas diferentes regiões (70). Por outro lado, estudos moleculares mostram positividade variada de 8,1 a 55%. No RS, a infecção por *E. canis* ainda não está bem estabelecida (85). Aqui, atribuí-se ao fato de possíveis reações cruzadas nos métodos sorológicos (86), e a possível não competência por parte do vetor encontrado no RS, *R. sanguineus s.l.*, em transmitir esta rickettsia (85,86).

2.4 DIAGNÓSTICO

As doenças transmitidas por vetores podem ser diagnosticadas através de sinais clínicos e exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados (9,10). Porém, o diagnóstico a partir de uma perspectiva clínica é um grande desafio, pois os sinais clínicos das doenças transmitidas por vetores são, por vezes, inespecíficos (54). Ademais, a morfologia dos agentes infecciosos é muito similar, e as espécies não podem ser distinguidas pela microscopia óptica. Por isso, o exame microscópico é considerado de baixa sensibilidade (9).

Além dos sinais clínicos e da microscopia, o diagnóstico tradicional pode incluir técnicas de hematologia, citologia, sorologia e isolamento. Entretanto, um diagnóstico definitivo exige técnicas moleculares (87), pois, muitos agentes são encontrados em baixo

número no sangue periférico, são difíceis de cultivar *in vitro*, a presença de anticorpos específicos pode ser inconsistente, além de reações cruzadas poderem acontecer entre alguns micro-organismos (2).

Métodos sorológicos como ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência (IF) são amplamente utilizados, pois são considerados métodos rápidos, facilmente padronizados e adequados para testes em massa. Porém, estes testes envolvem problemas de especificidade, refletindo em constantes reações cruzadas com diversos agentes infecciosos (88). Neste aspecto, o estudo realizado por Zanette et al. (88) demonstrou a presença de outros agentes infecciosos que podem ter reações cruzadas com os testes sorológicos de ELISA, IF e método cromatográfico (Kalazar Detect™) para leishmaniose. No estudo, as reações cruzadas foram com *Trypanosoma cruzi*, *E. canis*, *B. canis*, *T. gondii* e *Neospora caninum*.

Frente às muitas limitações dos métodos de diagnóstico das hemoparasitoses, muitos desses problemas podem ser evitados com o uso da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que permite a caracterização de diferentes patógenos, e auxilia no tratamento e prognóstico das doenças (2).

Para a detecção de piroplasmas caninos, alguns testes baseados na PCR têm sido desenvolvidos a fim de se tentar superar as limitações de algumas metodologias (89). Diante disso, para o diagnóstico de rangelirose, a PCR se faz necessária, em virtude de que, com frequência, se encontram piroplasmas em eritrócitos que são característicos de formas parasitárias de *R. vitalii* e *Babesia* spp. (12). Após o estudo de Soares et al. (90), a partir da sequência de um fragmento do gene 18S rRNA, *R. vitalii* passou a ser considerada uma espécie válida, pois comprovou-se que é um piroplasma geneticamente distinto (12).

Trata-se de um método muito sensível e específico, porém, resultados negativos de um teste PCR são mais difíceis de interpretar e não devem ser usados para excluir a presença de infecção (71), pois no caso das erliquioses, se amostras de sangue venoso são colhidas na fase subclínica ou crônica da doença (91), ou após o início do tratamento com antibiótico, ou se a extração não remove os inibidores de PCR na amostra (71), a técnica de PCR poderá gerar resultados falsos negativos. Portanto, as amostras de sangue devem ser colhidas antes da administração de antibióticos e submetidas a laboratórios de diagnóstico com rigoroso controle de qualidade (71).

Já para o diagnóstico de babesiose por PCR se dá tanto na fase aguda, quanto na subclínica e crônica, mesmo nos casos de baixas parasitemias e pode ser utilizado para

monitoramento de terapia, detecção de animais portadores de *Babesia* spp. e em estudos epidemiológicos (92).

Além dos métodos moleculares, a detecção das espécies de *Bartonella* pode ser feita através de cultura de sangue ou tecidos. Neste caso, as placas de agar devem conter 5% de sangue de carneiro ou coelho desfibrinado, mantidas à 35°C com uma concentração de 5% de CO₂ (57), porém, o isolamento dos agentes pode levar de 20 a 40 dias (3).

2.5 CONTROLE E TRATAMENTO

R. vitalii, *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp, *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., são agentes que ainda não possuem vacinas desenvolvidas contra eles (61), portanto a prevenção ainda é o meio mais eficaz de se evitar as doenças que estes patógenos causam (17).

Carrapatos, pulgas, mosquitos, flobotomíneos e piolhos podem portar patógenos que produzem doenças, que por sua vez, podem afetar os seres humanos (93). É sabido que a distribuição geográfica de hemoparasitas e de enfermidades causadas por eles estão relacionadas diretamente à distribuição dos seus vetores (94). Por isso, é necessário fazer o controle de parasitas externos em pequenos animais (93).

Os ectoparasiticidas podem ser administrados de forma profilática ou terapêutica. Para a eliminação de carrapatos e pulgas se faz necessário um tratamento, além disso, após o término da infestação, a maioria dos ectoparasiticidas da atualidade possui efeito residual, o que previne reinfestações. Além disso, todos os carrapatos observados em um animal devem ser removidos assim que visualizados (93).

O cuidado com o ambiente também é necessário. A aplicação de acaricidas em locais de infestação pode ser útil. Para as pulgas, o uso de aspiradores, em todas as áreas onde os animais passam a maior parte do tempo, deve ser incentivado (93).

Além dos cuidados com a infestação dos pequenos animais, é importante considerar que muitos destes agentes parasitários possuem carácter zoonótico. No caso dos carrapatos, a sua retirada dos animais necessita de cuidados, visto que estes devem ser destruídos com cautela, pois os fluídos podem conter patógenos. Já para as pulgas, existe um risco maior de contato com humanos, pois estas são transmitidas facilmente entre hospedeiros humanos e animais (93). Segundo informações da OMS em 2014, todos os anos, mais de um bilhão de pessoas são infectadas e mais de um milhão vem a óbito devido às doenças transmitidas por vetores (42).

3 CAPÍTULO 1

Vector-borne diseases agents in domestic dogs and cats from southern Brazil
J. Malheiros^a, M. M. Costa^b, R. B. do Amaral^c, K. C. M de Souza^c, M. R. André^c, R. Z.
Machado^c, M. I. B. Vieira^a

(Artigo submetido ao periódico Ticks and Tick-Borne Diseases - 2015)

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil.

^bLaboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil.

^cDepartamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil.

* Corresponding author: J Malheiros, Universidade de Cruz Alta, UNICRUZ, Campus Dr. Ulysses Guimarães – Jacob Della Méa Municipal Highway, Km 5.6 – Parada Benito. 98020-290 – Cruz Alta, RS, Brazil. Telephone +55 55 96324378. E-mail adress: jenifermalheiros@hotmail.com (J Malheiros).

1 ABSTRACT

2 Dogs and cats are often infected with vector-borne diseases (VBD) and play a crucial role in
3 their cycles, also acting as reservoirs, hosts, or sentinels. The aim of the present study was to
4 investigate the occurrence of VBD agents among domestic dogs and cats in the northwestern
5 region of Rio Grande do Sul (RS) State, Brazil. One hundred and ten blood samples were
6 collected from dogs (n= 80) and cats (n= 30). Blood smears, indirect enzyme-linked
7 immunosorbent assay (ELISA) for *B. vogeli* and *E. canis* (only for dogs) and polymerase
8 chain reaction (PCR) were carried out aiming the detection of VBD pathogens. The following
9 pathogens were screened by PCR among dogs: *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. (18S rRNA
10 gene), *Anaplasma* spp. (16S rRNA gene), and *Ehrlichia* spp. (dsb gene) whereas *Ehrlichia*
11 spp. (16S rRNA gene) and *Bartonella* spp. (nuoG gene) were investigated among cats, in
12 addition to those agents dogs were tested for. By blood smears we detected 20% (22/110) of
13 positive samples, of which 63,63% (14/22) and 9.09% (2/22) had morula-like cells in platelets
14 and monocytes, respectively. Structures morphologically compatible with piroplasms were
15 found in 27,27% (6/22). Anti-*B. vogeli* and anti-*E. canis* and *B. vogeli* antibodies were
16 detected in 91% (73/80) and 8.75% (7/80) of the dogs, respectively. Nineteen (17.27%)
17 animals were positive for some kind of hemoparasite in PCR. *Rangelia vitalii* 6/80 (7.5%), *B.*
18 *vogeli* 3/80 (3.75%), *Hepatozoon* spp. 1/80 (1.25%), and *Anaplasma* spp. 1/80 (1.25%) were
19 found in the dogs, and *Babesia* spp. 2/30 (6.66%) and *Bartonella* spp. 6/30 (20%) were
20 detected in the screened cats. No sample was positive for genes dsb and 16S rRNA of
21 *Ehrlichia* spp. Only animals positive for *R. vitalii* showed clinical signs compatible with
22 rangelirosis, such as anemia (100%), thrombocytopenia (66.7%), jaundice (50%), external
23 bleeding (50%), and anorexia (50%). We suggest that *R. vitalii* is one of the most frequent
24 vector-borne agents in RS. *Anaplasma* spp. and *Hepatozoon* spp. among dogs and *Bartonella*
25 spp. among cats were described for the first time in the region. Also, it was the first time that

26 was detected by molecular methods among domestic dogs and *B. vogeli* detected among
27 domestic dogs and cats in RS.

28 Keywords: VBD; ticks; Brazil; dogs; cats; PCR.

29 INTRODUCTION

30 Humans and animals that live in tropical and subtropical regions have been assailed by
31 the aggravation of parasitic diseases around the world (Dantas Torres and Otranto, 2014). In
32 this context, vector-borne diseases (VBD) are known as important emerging and re-emerging
33 illnesses (Vilhena et al., 2013), which are ubiquitous and easily disseminated (Maia et al.,
34 2015). VBD are a major public health problem, as some of them may affect both men and
35 domestic and wild animals (Yancey et al., 2014;). *Babesia* spp. (Schnittger et al., 2012),
36 *Rangelia vitalii* (Figuera et al., 2010), *Hepatozoon* spp. (Aydin et al., 2015), *Ehrlichia* spp.
37 (Corales et al., 2014), *Anaplasma* spp. (Aktas et al., 2015a), and *Bartonella* spp. (Mogollon-
38 Pasapera et al., 2009; Chomel et al., 2014) have been pointed out as important pathogens that
39 infect small animals.

40 In Brazil, *Babesia vogeli* and *Ehrlichia canis* are transmitted by the tick *Rhipicephalus*
41 *sanguineus*, whereas *R. vitalli* is transmitted by *Amblyomma aureolatum* (Dantas-Torres and
42 Otranto, 2014). *Hepatozoon canis* is admittedly transmitted by *R. sanguineus*; however, in
43 Brazil, studies have demonstrated that transmission also occurs by *Amblyomma ovale*
44 (Forlano et al., 2005; Demoner et al., 2013). *A. phagocytophilum* is transmitted by ticks of the
45 genus *Ixodes* in several regions of the world, but, in Brazil, there are some evidence showing
46 that this bacterium is transmitted by *Amblyomma cajennense* and *R. sanguineus* (Santos et al.,
47 2013). *A. platys* seems to be transmitted by *R. sanguineus* (Cardoso et al., 2015; Maia et al.,
48 2015), but Brazilian epidemiological data also suggest its transmission by *A. cajennense*
49 (Dahmani et al., 2015). On the other hand, *Bartonella* is transmitted by fleas, lice, and

50 phlebotomines, but, bacteria DNA has already been detected in ticks and flies (Chomel and
51 Kasten, 2010; Telford and Wormser, 2010; Yao et al., 2011).

52 Dogs and cats are often infected with VBD and play a crucial role in their cycles, also
53 acting as reservoirs, hosts, or sentinels (Day, 2011; Maia et al., 2015). Given the impact of
54 VBD, studies have been conducted to determine their geographical prevalence (Yuasa et al.,
55 2012). In Brazil, domestic dogs and cats may harbor a wide variety of parasitic agents;
56 however, information on their distribution and epidemiology is still fragmented (Dantas-
57 Torres and Otranto, 2014). Therefore, the aim of the present study was to investigate the
58 occurrence of VBD agents in domestic dogs and cats in the northwestern region of Rio
59 Grande do Sul (RS) State, Brazil.

60 **MATERIALS AND METHODS**

61 *Blood Specimens from Dogs and Cats*

62 Blood samples were collected in EDTA tubes from dogs (n= 80) and cats (n= 30)
63 treated at the Veterinary Hospital of Universidade de Passo Fundo (HV-UPF), in Passo
64 Fundo, in the northwestern region of RS, Brazil, between June and December 2014. Animals
65 with clinical signs and/or blood disorders compatible with VBD, presence of ticks (routine
66 procedure), or which had been referred for surgical sterilization (elective procedure) were
67 included in the present study. Blood was collected by venipuncture and used in serological
68 and molecular tests. A blood sample was collected from the internal portion of the pinna in
69 order to obtain blood smears and later staining by Giemsa and Panotic methods.

70 This study was approved by the Committee on Animal Research and Ethics of Universidade
71 de Passo Fundo, RS, Brazil, protocol no. 015/2014.

72 *Serology*

73 The presence of anti-*B. vogeli* and anti-*E. canis* IgG antibodies in the serum of dogs
74 was identified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a

75 commercially available kit (Imunodot Diagnósticos Ltda[®], Brazil). Optical density (OD) was
76 calculated from the average of negative controls x 2.5, according to the manufacturer's
77 instructions. The serological analysis of cats could not be performed.

78 *PCR amplification and sequencing*

79 The DNA was extracted from the blood samples using a commercially available kit
80 (DNeasy Blood & Tissue Kit[®], Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's
81 extraction protocol, yielding an elution volume of 200µL. To verify the existence of
82 amplifiable DNA in the samples, a PCR assay for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-
83 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was performed as previously described (Birkenheuer et
84 al., 2003).

85 The following agents were screened by PCR: *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp.,
86 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., and *Bartonella* spp. The PCR was carried out according to
87 the protocols previously described for genes 18s rRNA of *Babesia* spp. (Jefferies et al., 2007)
88 and *Hepatozoon* spp. (O'Dwyer et al., 2013), 16S rRNA of *Anaplasma* spp. (Massung et al.,
89 1998), and *Ehrlichia* spp. (Murphy et al., 1998), dsb of *Ehrlichia* spp. (Doyle et al., 2005),
90 and nuoG of *Bartonella* spp. (André et al., 2015a). Table 1 provides information on primers
91 and reaction conditions. The positive controls used in the PCR were obtained from
92 experimentally infected dogs, in the case of *E. canis* (Castro et al., 2004) and *B. vogeli* (Furuta
93 et al., 2009), in the case of naturally infected domestic and wild dogs, in the case of
94 *Hepatozoon* spp. (André et al., 2010) and *Anaplasma* spp. (Souza et al., 2013), and in the case
95 of DNA fragments of *Bartonella* spp. and *E. canis*, used for qPCR, inserted into commercially
96 available plasmids (Integrated DNA Technologies[®], Brazil).

97 After amplification by conventional PCR assays, the amplicons were subjected to 1% agarose
98 gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The positive PCR products were
99 purified by Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Lithuania). The sequencing was

100 carried out using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI PRISM 310
101 DNA Analyzer (Applied Biosystems[®]).

102 *Phylogenetic analysis*

103 Consensus sequences were obtained through the analysis of the sense and antisense
104 sequences using the CAP3 program (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>).
105 Comparisons with sequences deposited in GenBank were done using the basic local alignment
106 search tool (BLAST) (Altschul et al., 1990). The sequences were aligned with sequences
107 published in GenBank using Clustal/W (Thompson et al., 1994) in Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall,
108 1999). Phylogenetic inference was based on maximum likelihood (ML) inference. The ML
109 phylogenies were inferred with RAxML-HPC BlackBox 7.6.3 software (Stamatakis et al.,
110 2008) (which includes an estimation of bootstrap node support) through the CIPRES Science
111 Gateway (Miller et al., 2010), using a GTR+GAMMA model of evolution and 1000
112 bootstrapping replicates. The trees were examined in Treegraph 2.0.56-381 beta (Stover and
113 Muller, 2010).

114 **RESULTS**

115 In this study, 68.18% (75/110) of the animals were submitted to elective procedures
116 (48 dogs and 27 cats) and 31.81% (35/110) to routine procedures at HV-UPF (32 dogs and 3
117 cats). The results of PCR-positive animals submitted to both types of procedures are shown in
118 Table 2.

119 *Blood Smears*

120 The blood smears revealed a total of 20% (22/110) positive samples. Morula-like
121 structures were observed in the platelets of 14 (63,63%) dogs and in the monocytes of two
122 (9,09%) dogs. Structures morphologically compatible with piroplasms were found in six
123 (27,27%) dogs (Fig. 1).

124 *Serology*

125 The serum samples of dogs whose OD values were equal to or greater than 0.3325 and
126 0.4175 were considered to be positive for the presence of anti-*B. vogeli* and anti-*E. canis*
127 antibodies, respectively. Among the sampled dogs, seropositive results corresponded to 91%
128 (73/80) and 8.75% (7/80) for *B. vogeli* and *E. canis* and *B. vogeli*, respectively. None of the
129 dogs had only one anti-*E. canis* antibody.

130 *PCR, Sequencing, and Phylogenetic Analysis*

131 Nineteen (17.27%) of 110 animals had PCR-positive results for some type of
132 hemoparasite. *R. vitalii* 6/80 (7.5%), *Babesia* spp. 3/80 (3.75%), *Hepatozoon* spp. 1/80
133 (1.25%), and *Anaplasma* spp. 1/80 (1.25%) were detected in the dogs while *Babesia* spp. 2/30
134 (6.66%) and *Bartonella* spp. 6/30 (20%) were found in the cats.

135 None of the samples tested for *dsb* and 16S rRNA genes of *Ehrlichia* spp. in dogs and
136 cats was positive, respectively.

137 Of 110 samples tested for the gene 18S rRNA of *Babesia* spp., 11 (10%) were
138 positive, and five of them were phylogenetically related to *R. vitalii* detected in domestic dogs
139 in RS whereas one sample was phylogenetically related to *R. vitalii* found in wild carnivores
140 of the species *Cerdocyon thous* (GenBank access numbers HQ150006 and KF964151,
141 respectively). The other positive dogs (3) and cats (2) revealed 100% identity with *B. vogeli*
142 (HM590440) (Fig. 2). The six sequences of *R. vitalii* were deposited in GenBank under access
143 number KT323926, KT323927, KT323928, KT323929, KT323920 and KT323931, as well as
144 the five sequences of *B. vogeli*, with access number KT323932, KT323933, KT323934,
145 KT323935 and KT323936.

146 Only one dog (0.9%) (GenBank access number KT323037) was positive for gene 18S
147 rRNA of *Hepatozoon* spp. with 100% identity with *H. canis* detected in a Spanish red fox
148 (GenBank access number AY150067). Phylogenetically, this sequence was found within the
149 same clade of *H. canis* detected in a dog from Porto Alegre, state capital of RS (Fig. 3).

150 Likewise, only one (0.9%) dog was positive for the 16S rRNA gene of *Anaplasma* spp.
151 (GenBank access number KT323925), close to *A. phagocytophilum* in the phylogenetic tree,
152 with a 100% identity with a European sample (GenBank access number CP006618) of this
153 pathogen (Fig. 4).

154 Six cats (20%) were positive in qPCR for *Bartonella* spp. based on gene *nuoG*.

155 At the time of collection, 50% (3/6) of dogs positive for *R. vitalli*, and both dogs
156 positive for *Hepatozoon* spp. and *Anaplasma* spp. were infected by ticks, which were not
157 identified. Ticks were not detected or reported in the remaining animals.

158 **DISCUSSION**

159 While *E. canis* has been frequently detected in dogs in all Brazilian regions, except in
160 the south (Vieira et al., 2013), *E. canis* or, at least, an agent closely related to it, has been
161 occasionally reported in cats from the states of Minas Gerais (MG) (Oliveira et al., 2009),
162 Maranhão (MA) (Braga et al., 2012), Mato Grosso (MT) (Braga et al., 2012), and Mato
163 Grosso do Sul (MS) (André et al., 2015). However, in this study, neither dogs nor cats were
164 positive for this pathogen. By investigating the context in which *R. sanguineus* is a vector for
165 *E. canis*, Moraes-Filho et al. (2011) observed the presence of two lineages of this tick, one of
166 which is a temperate lineage (from Spain) detected in RS, Brazil (where the present study was
167 undertaken), Chile, Argentina, and Uruguay, unlike the other specimens found in other
168 Brazilian regions, which were akin to tropical lineages (from South Africa) of *R. sanguineus*.
169 Thus, it may be inferred that this lineage of *R. sanguineus* is not capable of transmitting *E.*
170 *canis* (Krawcsak et al., 2012; Lasta et al., 2013; Cicuttin et al., 2015), since canine monocytic
171 ehrlichiosis (CME) is the most widely disseminated disease in Brazil (Vieira et al., 2011), and
172 failure to detect this pathogen in this region, also in the present study, could thus be
173 justifiable. On the other hand, serological tests for the detection of anti-*E. canis* antibodies
174 revealed 8.75% (7/80) of positive dogs, unlike the results obtained by Lasta et al. (2013), who

175 did not find any seropositive animal in their study, in the city of Porto Alegre, state capital of
176 RS. Nevertheless, the study of Krawcsak et al. (2012), conducted in the central region of RS,
177 showed 4.43% of seropositive animals for *E. canis* in the immunofluorescence assay and, in
178 this case, according to the authors, cross-reactions with other species of *Ehrlichia*, or even
179 with other agents of the family Anaplasmataceae might occur. However, the dog that was
180 positive for *Anaplasma* spp. in this study was not positive for *E. canis*. Moreover, 20% of the
181 blood smears revealed morula-like structures in platelets and leukocytes, but these findings
182 were not confirmed by the serological tests and PCR. Hence, according to Dagnone et al.
183 (2009), cytoplasmic inclusions resemble those inclusions resulting from severe bacterial
184 infections (Döhle bodies), inflammation, neoplasms, autoimmune diseases, viral infection
185 (canine distemper), and severe tissue damage.

186 The detection of *A. platys* may range from 7.8% to 88% in Brazil (Santos et al.,
187 2013). In RS, the detection of this pathogen is described in the study of Lasta et al. (2013),
188 who found 14.07% of positive dogs in PCR. In addition, *A. platys* has also been reported in
189 cats in Brazil (Lima et al., 2010; Correa et al., 2011), but no cat was positive in our study. On
190 the other hand, reports on *A. phagocytophilum* are few and far between in Brazil and include
191 the detection of the pathogen in dogs by qPCR (Santos et al., 2011; Santos et al., 2013;
192 Silveira et al., 2015), but there are no data for RS; notwithstanding, our study indicates the
193 presence of *Anaplasma* spp., which is closely related to *A. phagocytophilum* (GU236670).
194 Additionally, *Anaplasma* spp. closely related to *A. phagocytophilum* has been detected in wild
195 carnivores (André et al., 2012), wild birds (Machado et al., 2012), wild deer (Silveira et al.,
196 2014), and free-roaming cats (André et al., 2014) in Brazil. We highlight that the vectors for
197 *Anaplasma* species have not been clearly defined in Brazil, and that transmission is assumed
198 to occur through *R. sanguineus* and *A. cajennense* (Santos et al., 2013). However, *A.*
199 *cajennense* has not been detected in RS so far.

200 Rangeliosis, after having been overlooked for over 50 years, is currently regarded as a
201 re-emerging disease in Brazil (Soares et al., 2014). Reports on canids are more frequent in the
202 southern and southeastern regions, including the states of Rio de Janeiro (RJ) (Lemos et al.,
203 2012), São Paulo (SP) (Pestana, 1910; Carini and Maciel, 1914), and RS (Loretti and Barros,
204 2005; Figuera et al., 2010). Aside from Brazil, rangeliosis has already been described in
205 Argentina (Eiras et al., 2014) and in Uruguay (Sarasúa and Donati, 1976; Soares et al., 2015),
206 countries where *A. aureolatum* is also found (Guglielmone et al., 2002; Venzal et al., 2005).
207 In RS, where the disease appears to be more common, a retrospective study of Figuera et al.
208 (2010) identified 35 cases of *R. vitalii* infection in necropsy and histopathological samples
209 examined from 1985 to 2009. Besides these studies, other ones conducted in RS in recent
210 years demonstrate the presence of *R. vitalii* in dogs (Krauspenhar et al., 2003; Soares et al.,
211 2011), including a study of ours about domestic dogs in which five positive animals were
212 detected (Gottlieb, 2014), in addition to positive results for one wild carnivore (Soares et al.,
213 2014). Therefore, this study corroborates the assumption that *R. vitalli* is one of the most
214 frequent VBD agents in RS; however, we suggest that further studies be carried out in other
215 regions of RS and across Brazil in order to get to know the actual epidemiological profile of
216 the disease.

217 *B. vogeli* has already been described in Africa, Asia, Europe, Americas, and Australia.
218 In Brazil, *B. vogeli* and *B. gibsoni* are the only species described in dogs so far (Passos et al.,
219 2005; Trapp et al., 2006; Dantas-Torres and Otranto, 2014); nevertheless, the vector for *B.*
220 *gibsoni* has not been detected in Brazil yet (Trapp et al., 2006). On the other hand, *R.*
221 *sanguineus* is widely distributed in Brazil and adapts well to urban areas, which may
222 contribute towards the endemic status of babesiosis in some Brazilian regions (Costa et al.,
223 2015). Furthermore, dog-specific *Babesia* species have been sporadically detected by
224 molecular methods in domestic cats, also in Brazil, where new *Babesia* spp. and *Theileria*

225 spp. genotypes related to ruminant and equine piroplasmosis have been recently reported in
226 cats in southeastern and midwestern regions of Brazil (André et al., 2014, 2015a), thus
227 highlighting the need for molecular characterization of circulating piroplasmids in domestic
228 animals. In RS, molecular confirmation of *B. vogeli* in dogs and cats was reported for the first
229 time in this study, since, to our knowledge, there is no molecular study in this region that
230 shows positive results for the genus *Babesia*, either in dogs or cats, thereby underscoring the
231 importance of such finding. Although *R. sanguineus* is considered the vector for *B. vogeli*, the
232 vectorial competence of temperate lineage of *R. sanguineus* found in RS for this piroplasmid
233 is still unknown.

234 This study also detected seropositive results for *B. vogeli* in 91% of the dogs, unlike the
235 findings of the studies of Vieira et al. (2013), who found 60.3% of positive dogs in indirect
236 immunofluorescence (IF), also in southern Brazil. Out of 91%, 2 of 3 PCR-positive dogs for
237 *B. vogeli* were also seropositive. Therefore, the animals described herein were assumed to be
238 in the chronic stage of the disease, which is often asymptomatic (Schnnittger et al., 2012) and,
239 consequently, the levels of circulating parasites were below the PCR detection threshold,
240 which, according to some authors (Birkenheuer et al., 2004; Jefferies et al., 2007; Irwin,
241 2009), may lead to false negative results at this stage. Moreover, cross-reactions with antigens
242 of other piroplasmids, such as *R. vitalii*, might have occurred when all the animals with
243 positive PCR results for *R. vitalii* were considered to be also positive in the serum tests for
244 anti-*B. vogeli* antibodies; in addition, RS is not regarded as an endemic area for babesiosis,
245 and the vector for this piroplasm, *A. aureolatum*, is also found in this Brazilian state (Evans et
246 al., 2010; Martins et al., 2004; Gauger et al., 2013; Soares et al., 2014). Additionally, seven
247 animals were seropositive for anti-*B. vogeli* and anti-*E. canis* antibodies, including two
248 positive dogs for *R. vitaili* in PCR, demonstrating possible exposure to these agents, as
249 reported in other Brazilian studies, for example the one conducted by Trapp (2006) and Souza

250 et al. (2013), who detected 14% and 56.6% of seropositive dogs for *B. canis* and *E. canis*. So,
251 as *R. sanguineus* is potentially involved in the transmission of at least nine pathogens that
252 infect dogs in Brazil (Dantas-Torres et al., 2008), coinfection with these agents is expected.

253 In our study, only one dog was positive for *Hepatozoon* spp. by PCR, unlike other
254 Brazilian studies, which report levels around 58% (Spolidorio et al., 2009) and 67% (Rubini
255 et al., 2005), or as high as 84.3% in dogs from a rural area in southeastern Brazil (Miranda et
256 al., 2014). Nonetheless, according to Miranda et al. (2014), the prevalence rates for infection
257 caused by this pathogen may vary depending on the study design, sampling method,
258 characteristics of the canine population, vector distribution, and diagnostic methods.

259 In addition to the detection of *Hepatozoon* in dogs, the present study did not find any
260 positive cat despite the fact that *H. canis* (Rubini et al., 2008), *H. felis* (de Bortoli et al., 2012)
261 and a new genotype of *Hepatozoon* sp. (André et al., 2015) have been occasionally reported in
262 cats in Brazil. Additionally, the protozoan has already been detected in foxes in RS (Criado-
263 Fornelio et al., 2006) and in other wild canids in southeastern Brazil (André et al., 2010). We
264 found *Hepatozoon* spp. phylogenetically related to *H. canis* in Spanish red foxes; the findings
265 of Criado-Fornelio et al. (2006) and André et al. (2010), however, were phylogenetically
266 related to *H. americanum* in the USA and Spain, respectively.

267 The presence of *Hepatozoon* spp. in this region is expected, since studies indicate that
268 the ticks that transmit this protozoan are *R. sanguineus* and *Amblyomma ovale* (Forlano et al.,
269 2005; Demoner et al., 2013), whose presence is well-established in RS (Guglielmone et al.,
270 2003; Gauger et al., 2013). However, even though *R. sanguineus* is considered to be the main
271 vector for this protozoan, in the study of Demoner et al. (2013), the vectorial competence of
272 this tick in dogs naturally infected by *H. canis* was regarded as low or negligible; but the ticks
273 used in the experiment came from southeastern Brazil, and probably belonged to the tropical
274 lineage of *R. sanguineus*.

275 The molecular prevalence of *Bartonella* in Brazilian cats ranges from 4.3% to 97.3%,
276 according to studies conducted in the states of RJ, SP, MA, MT, MS and RS (Souza et al.,
277 2010; Steggemeier et al., 2010; Bortoli et al., 2012; Braga et al., 2012; Miceli et al., 2013;
278 André et al. 2014, 2015b). In these studies, it is important to take into account the different
279 molecular methods used (conventional PCR or qPCR), in addition to the type of sampled
280 population (stray cats, owned cats, or catteries). In our study, the frequency of positive cats
281 for *Bartonella* spp. was equal to 20%, in which all animals were owned, but four of them
282 lived in the same house, which could have facilitated transmission. Similar results were found
283 by Miceli et al. (2013) and Staggemeier et al. (2014), who identified 17% and 25.53% of
284 positive cats for *Bartonella* spp. in catteries in the state of MT and RS, respectively. Unlike
285 this study, in which it was not possible to perform the genetic sequencing of samples positive
286 for *Bartonella* in qPCR, both authors have detected the species *B. henselae* and *B.*
287 *clarridgeiae*, causing the cat-scratch disease in humans.

288 None of the positive cats for *Bartonella* spp. in qPCR had clinical signs of infection. It
289 is known that cats are the major reservoirs for *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae*,
290 and that the infection is usually subclinical or shows nonspecific clinical signs (Maia et al.,
291 2014). The transmission of *B. henselae* and *B. clarridgeiae* is flea-borne (Kaiser et al.,
292 2011), although studies suggest that the transmission of *B. henselae* is also tick-borne
293 (Telford and Wormser, 2010).

294 In this study, a higher frequency of positive animals was observed among animals
295 submitted to elective procedures (14/19), probably because these animals could be chronic
296 and asymptomatic carriers of these pathogens. Therefore, the only animals with positive blood
297 smears with later molecular confirmation were those positive for *R. vitalli* (6/6), given that
298 these animals had been submitted to routine procedures and were the only ones with acute
299 disease compatible with rangeliosis at the time of collection. The findings, consistent with

300 those described in the literature (França et al., 2014), were anemia (100%), thrombocytopenia
301 (66.7%), jaundice (50%), external bleeding (50%), and anorexia (50%).

302 All of the other animals with positive PCR results had negative blood smears and
303 showed no clinical and/or laboratory findings compatible with infection by their respective
304 agents (data not shown). In this case, infected dogs and cats may sometimes present with
305 nonspecific clinical signs, low parasitemia due to subclinical or chronic disease, hindering the
306 diagnosis of VBD (Spolidorio et al. 2009; Solano-Gallego and Baneth, 2011; Maia et al.,
307 2014). Furthermore, serological assays may have cross-reactions, and direct detection by
308 blood smears has poor sensitivity and specificity. Thus, molecular methods play an important
309 role in the detection and differentiation of these agents (Little, 2010).

310 **CONCLUSION**

311 This study shows the presence of *R. vitalii*, *B. vogeli*, *Hepatozoon* spp., *Anaplasma*
312 spp. and *Bartonella* spp. in domestic dogs and cats in RS. Moreover *B. vogeli* was detected by
313 a molecular method for the first time among domestic dogs and cats from RS, and
314 *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. and *Bartonella* spp. were described for the first time in the
315 region of this study. We suggest that *R. vitalii* is one of the most frequent VBD agents among
316 dogs in RS. However, further studies should be performed in Brazil in order to obtain the
317 actual epidemiological profile of these protozoans and of other VBD agents.

REFERENCES

- Aktas, M., Özübek, S., Altay, K., Ipek, N.D.S., Balkaya, I., Utuk, A.E., Kirbas A., Simsek S, Dumanli N. 2015a. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites & Vectors*. 8,157.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.,. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215,403-410.
- André, M.R., Adania, C.H., Teixeira, R.H.F., Vargas, G.H., Falcade, M., Sousa, L., Salles, A.R., Allegretti, S.M., Felipe, P.A.N, Machado, R.Z. 2010. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. *Vet. Parasitol.* 173, 134-138.
- André, M.R., Dumler, J.S., Scorpio, D.G., Teixeira, R.H., Allegretti, S.M., Machado, R.Z. 2012. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in brazilian and exotic captive carnivores. *Ticks Tick-borne Dis.* 3, 247-253.
- André, M.R. Denardi, N.C.B., de Souza, K.C.M., Gonçalves, L.R., Henrique, P.C., Ontivero, C.R.G.R., Gonzalez, I.H.L., Nery, C.V.C., Chagas, C.R.F., Monticelli, C., Santis, A.C.G., Machado, R.Z. 2014. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks and Tick-borne Dis.* 5, 545-551.
- André, M.R., Dumler, J.S., Herrera, H.M., Gonçalves, L.R., Souza, K.C.M. de, Scorpio, D.G., Santis, A.C.G.A. de, Domingos, I.H. Macedo, G.C., Machado, R.Z. 2015a. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. *J. Feline Med. Surgery.* 1-9.
- André, M.R., et al. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks Tick-borne Dis.* (2015b), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.004>
- Aydin, M.F., Sevin, F., Sevin, M. 2015. Molecular detection and characterization of *Hepatozoon* spp. in dogs from the central part of Turkey. *Ticks and Tick-borne Dis.* 6,388-392.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172-4177.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B. 2004. Efficacy of combined atovaquone azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 494-498.
- Bortoli, C.P., André, M.R., Pinto, A.A., Machado, S.T.Z., Machado, R.Z. 2012. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboicabal, SP, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21,219-223.

Braga, M. do S.C de O., Diniz, P.P.V. de P. André, M.R., Bortoli C.P de, Machado, R.Z. 2012. Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhao, north-eastern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 107, 772-777.

Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H.C.E., Nachum-Biala, Y., Lopes, A.P., Vila-Voçosa, M.J., Simoes, M., Rodrigues, P.A., Baneth, G. 2015. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. Parasites & Vectors. 8,144.

Carini, A., Maciel, J. 1914. Sobre a moléstia dos cães chamada nambi-uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalli*). An. Paul. Med. Cirurg. 3: 65-71.

Castro, M.B., Machado, R.Z., de Aquino, L.P., Alessi, A.C., Costa, M.T. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet. Parasitol. 119:73-86.

Cicuttin, G.L., Tarragona, E.L., de Salvo, M.N., Mangold, A.J., Nava S. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) from Argentina. Ticks and Tick-borne Dis. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.06.006>

Chomel, B.B., Kasten, R.W., Stuckey, M.J., Bretschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Henn, J.B., Koehler J.E., Chang C. Experimental infection of cats with *Afipia felis* and various *Bartonella* species or subspecies. Vet. Microbiol. 2014;172(2014):505-510.

Chomel, B.B, Kasten, R.W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. J. Appl. Microbiol. 2010;109(2010):743-750.

Corales, J.M., Vilorio, V.V., Venturina, V.M., Mingala, C.N. 2014. The prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs in Nueva Ecija, Philippines based on multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay. Annals of Parasitol. 60,267-272.

Correa, E.S., Paludo, G.R., Scalon, M.C., Machado, J.A., Lima, A.C.Q., Pinto, A.T.B., Thiebaut, J.T.L., Albernaz, A.P. 2011. Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. Pesquisa Vet Bras. 31, 899-909.

Costa, A.P., Costa, F.B., Labruna, M.B., Silveira, I., Moraes-Filho, J., Soares, J.F., Spolidorio, M.G., Guerra R.M.S.N.C. 2015. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil.

Criado-Fornelio, A., Ruas, J.L., Casado, N., Farias, N.A., Soares, M.P., Muller, G., Brumt, J.G., Berne, M.E., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C. 2006. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeorina) from Brazil and Spain. J. Parasitol. 92, 93-99.

Dagnone, A.S., de Souza, A.I., André, M.R., Machado, R.Z. 2009. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. Rev Bras Parasitol Vet. 18, 20-25.

- Dahmani, M., Marié, J.L., Mediannikov, O., Raoult, D., Davoust, B. 2015. First Identification of *Anaplasma platys* in the Blood of Dogs from French Guiana. *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 15,170-172.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D. 2014. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the Black box. *Parasites & Vectors.* 7,22.
- Dantas-Torres, F. 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors.* 1, 25.
- Day, M.J. 2011. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasites & Vectors.* 4,49.
- Demoner, L.de C., Rubini, A.S., Paduan, K. dos S., Metzgera, B. Antunes, J.M.A de P., Martins, T.F., Mathias, M.I.C, O'Dwyer, L.H. 2013. Investigation of ticks vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks and Tick-borne Dis.* 4, 542-546.
- 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. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *J Mol Diagn.* 7, 504-510.
- Eiras, D.F., Craviotto, M.B., Baneth, G., Moré, G. 2014. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. *Parasitol. Int.* 63,729-734.
- Evans, D.E., Martins, J.R., Guglielmone, A.A. 2000. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil: their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95, 453-470.
- França, R.T., Silva, A.S., Loretto, A.P., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A. 2014. Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current Day – A review. *Ticks and Tick-borne Dis.* 5,466-474.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.G., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L. 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesq. Vet. Bras.* 30, 974-987.
- Forlano, M., Scofield, A., Fernandes, K.R., Ewing, S.A., Massard, C.L. 2005. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 1-7.
- Furuta, P.I., Oliveira, T.M., Teixeira, M.C., Rocha, A.G., Machado, R.Z., Tinucci-Costa, M.G. 2009. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18: 41-45.
- Gauger, A.L., Vivian, C.C., Vieira, M.I.B., Andrade, C.G. Luz, H.R. Landulfo, G.A. Faccini, J.L.H. Barros-Batesti, D.M. 2013. Ticks in dogs treated at the hospital of university of Passo Fundo – RS, Brasil. IV Simpósio Brasileiro de Acarologia, Rio Grande do Sul, Brazil.

Gottlieb, J. *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rangelia vitalii*: aspectos clínicos, parasitológicos, hemato-sorológicos e moleculares de cães infectados da região de Passo Fundo-RS-Brasil [dissertation]. Passo Fundo: University of Passo Fundo; 2014.

Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Boero, C., Azcue, R. 2002. Nuevo registro de *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (= *Amblyomma striatum* Koch, 1844) em Entre Ríos, Argentina. Rev. FAVE, Ci. Vet. 1.

Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Martins, J.R., Venzal, J.M., Arzua, M., Keirans, J.E. 2003. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rRNA sequences. Vet. Parasitol. 113, 273-278.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp.Ser. 41, 95–98.

Irwin. P.J. 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasites & Vectors. 2, S4.

Jefferies, R., Ryan, U.M, Jardine, J., Robertson, I.D., Irwin, P.J. 2007. *Babesia gibsoni*: detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. Exp. Parasitol. 117,115-123.

Kaiser, P.O., Riess, T., O'Rourke, F., Linke, D., Volkhard, A.J.K. 2011. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. Int. J. Med. Microbiol. 301, 7-15.

Krauspenhar. C., Figuera. R.A., Graça. D.L. 2003. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. Medvep – Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim. 1, 273-281.

Krawczac. F.S., Labruna. M.B., Sangioni. L.A., Vogel. F.S.F., Soares. J.F., Lopes. S.T.A. 2012. Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region os Rio Grande do Sul. Rev Parasitol Vet. 21, 415-417.

Lasta, C.S., dos Santos, A.P., Messick, J.B., Oliveira, S.T., Biondo, A.W., Vieira, R.F.C., Dalmolin, M.L., González, F.H.D. 2013. Molecular detection os *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in southern Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 22:360-366.

Lemos, T.D., Cerqueira, A.M.F., Tomas, H.K., Silva, A.V., Corrêa, R.G.B., Paludo, G.R. 2012. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 137-142.

Lima, M.L.F., Soares, P.T., Ramos, C.A.N., Araújo, F.R., Ramos, R.A.N., Souza, I.I.F., Faustino, M.A.G., Alves, L.C.A. 2010. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. Bra J Microbiol. 41, 381-385.

Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. 2010. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 40, 1121-1140.

- Loretti, A.P., Barros, S.S. 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. 134, 193-213.
- Machado, R.Z., André, M.R., Werther, K., de Sousa, E., Gavioli, F.A., Alves JR, J.R.F. 2012. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? Vector-borne Zoonotic Dis. 8, 705-708.
- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M.C., Cristovão J.M., Ramos C., Martins A, Martinho F., Silva P., Neves N., Nunes M., Vieira M.L., Cardoso L., Campino L. 2015. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. Parasites & Vectors. 8,138.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L., Campino, L. 2014. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. Parasites & Vectors. 7, 115.
- Martins, J.R., Reck Jr., J., Doyle, R.L., da Cruz, N.L.C., Vieira, A.W.deM., Souza, U.A. 2010. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19, 189-191.
- Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J. Clin. Microbiol. 36, 1090-1095.
- Miceli, N.G., Gavioli, F.A., Gonçalves, L.R., André, M.R., Souza, K.C.M. de, Machado, R.Z. 2013. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 3, 385-390.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, 1 – 8.
- Miranda, R.L., O'Dwyer, L.H., de Castro, J.R., Metzger, C.B., Rubini, A.S., Wundim, A.V., Eyal, O., Talmi-Frank, D., Cury, M.C., Baneth, G. 2014. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in southeast Brazil. Res. Vet. Science. 97, 326-329.
- Mogollon-Pasapera, E., Otvos Jr, L., Giordano, A., Cassone, M. 2009. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? Int. J. Infectious Dis. 13, 3-8.
- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F.A., Richtzenhain, L.J., Labruna, M.B. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. Acta Tropica. 117, 51-55.
- Murphy, G.L., Ewing S.A., Whitworth L.C., Fox J.C, Kocan A.A. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. Vet. Parasitol. 79, 325-339.
- O'Dwyer, L.H., Moço, T.C., Paduan, K, dos.S., Spenassatto, C., da Silva, R.J., Ribolla, P.E. 2013. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from

Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Exp. Parasitol.* 135, 200-207.

Oliveira, L.S., Moura, L.C., Oliveira, K.A., Agostini, M., Oliveira, A.C., de Almeida, M.R., Fietto, J.L.R., Conceição, L.G., Filho, J.D.R., Galvão, M.A.M., Mafra, C. 2009. *Clin Microbiol Inf.* 15, 53-54.

Passos, L.M.F., Geigerb, S.M., Ribeiro, M.F.B., Pfisterb, K., Zahler-Rinder, M. First. 2005. Molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 127,81-85.

Pestana, B.R. 1910. O nambyuvú. *Rev. Med.* 22, 423-426.

Rubini, A.S., Paduan, K. dos S., Cavalcante, G.G., Ribolla, P.E.M., O'Dwyer, L.H. 2005. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitol. Res.* 97, 91-93.

Rubini, A.S., Paduan, K. dos S., Lopes, V.V.A., O'Dwyer, L.H. 2008. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil.

Santos, H.A., Thomé, S.M., Baldani, C.D., Peixoto, M.P., Pires, M.S. 2013. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & Vectors.* 6,348.

Santos, H.A., Pires, M.S., Vilela, J.A.R., Santos, T.M., Faccini, J.L.H., Baldani, C.D., Thomé, S.M.G., Sanavria, A., Massard, C.L. 2011. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagnostic Investigation.* 23, 770-774.

Sarasúa, L.M., Donati, N.R. 1976. Constatación de babesiosis canina em el depto de Artigas (Uruguay). *Veterinaria.* 62,137-139.

Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A. 2012. *Babesia*: a world emerging. *Infection, Genetics and Evolution.* 12, 1788-1809.

Silveira, J.A.G., Valente, P.C.L.G. Paes, P.R.O., Vasconcelos, A.V., Silvestre, B.T., Ribeiro, M.F.B.R. 2015. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks Tick-borne Dis.* 6, 242-245.

Soares, J.F., Carvalho, L., Maya, L., Dutra, F., Venzal, J.M., Labruna, M.B. 2015. Molecular detection of *Rangelia vitalli* in domestic dogs from Uruguay. *Vet Parasitol.* 201, 98-101.

Soares, J.F., Dall'Agnol, B., Costa, F.B., Krawczaka, F.S., Comerlatoc, A.T., Rossatod, B.C.D., Linck, C.M., V

ieira, M.I.B., Martins, J.R., Reck, J., Labruna, M.B. 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet Parasitol.* 202,156-163.

Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T.A., Llopes, S.T.A., Labruna, M.B. 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet Parasitol.* 180, 203-208.

- Solano-Gallego, Baneth G. 2011. Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.* 181,48-60.
- Sousa, K.C., André, M.R., Herrera, H.M., Andrade, G.B., Jusi, M.M.G., Santos, L.L., Barreto, W.T.G., Machado, R.Z., de Oliveira, G.P. 2013. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 525-531.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Zago, A.M, Donatele, D.M., Caliari, K.M., Yoshinari, N.H. 2009. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 163, 357-361.
- Staggemeier, R., Pilger, D.A., Spilki, F.R., Cantarelli, V.V. 2014. Multiplex SYBR green-real time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 56, 93-95.
- Staggemeier, R., Venker, C.A., Klein, D.H., Petry, M., Spilki, F.R., Cantarelli, V.V. 2010. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105, 873-878.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Society of Systematic Biologists.* 57, 758-771.
- Stover, B.C., Muller, K.F. 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics,* 11, 1-9.
- Telford, S.R., Wormser, G.P. 2010. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. *Emerg. Inf. Dis.* 16, 379-384.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Acids Res.* 22, 1673-4680.
- Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., Morais, H.S.A. 2006. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 141,177-180.
- Venzal, J.M., Féliz, M.L., Olsmos, A., Mangold, A.J., Guglielmo .A.A. 2005. A collection of ticks (Ixodidae) from birds in Uruguay. *Exp. Applied Acarology.* 36, 325-331.
- Vieira, R.F. da C., Biondo, A.W., Guimarães, A.M.S., dos Santos, A.P., dos Santos, R.P., Dutra, L.H. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(1):1-12.
- Vieira, R.F.da C., Vieira, T.S.W.J., Nascimento, D. do A.G., Martins, T.F., Krawczak, F.S., Labruna, M.B., Chandrashekar, R., Marcondes, M., Biondo, A.W., Vidotto, O. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev Int Med Trop.* 55, 335-340.

Vilhena, H., Díaz, V.L.M., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor J., Silvestre-Ferreira A.C. 2013. Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*. 6, 1-6.

Yao, C., Zhu, C., Pan, X., Hua, X., Yuan, C. 2011. A review of the prevalence of emerging Bartonellosis in humans and animals in China. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 4248-4252.

Yancey, C.B., Hegarty, B.C., Qurollo, B.A., Levy, M.G., Birkenheuer, A.J., Weber, D.J., Diniz P.V.P., Bretschwerdt, E.B. 2014. Regional Seroreactivity and vector-borne disease co-exposures in dogs in the United States from 2004-2010. *Vector-Borne and Zoonotics Dis.*14, 724-732. DOI: 10.1089/vbz.2014.1592

Yuasa, Y., Hsu, T-H., Chou, C-C., Huang, C-C., Huang, W-C., Chang, C-C. 2012. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species, and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Inf. Dis.* 35, 599-606.

Table 1.
Primer sets for PCR amplification of VBD agents.

Pathogen	Gene	Primers and Probes (5'-3')	Product size (bp)	PCR conditions	Reference
<i>Babesia</i> spp. (n-PCR)	18S rRNA	BTF1 GGCTCATTACAACAGTTATAG BTR1 CCCAAAGACTTTGATTCTCTC BTF2 CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC BTR2 GGACTACGACGGTATCTGATCG	790	1°) 94°C 3min, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 45 cycles (94°C 30 s, 58°C 20 s, 72°C 30 s), 72°C 7 min, 2°) Just the annealing temperature was increased to 62°C.	Jefferies et al., 2007
<i>Hepatozoon</i> spp.	18S rRNA	HepF300 GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACG Hep900 CAAATCTAAGAATTC ACCTCTGAC	581	94°C 3 min, 35 cycles (94°C 45 sec, 56°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 7 min	O'Dwyer et al., 2013
<i>Anaplasma</i> spp. (n-PCR)	16S rRNA	ge3a CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC ge10r TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC ge9f AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT) ge2 GGCAGTATTAAGAAGCAGCTCCAGG	546	1°) 95°C 2 min, 40 cycles (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72° 1 min), 72°C 5 min, 2°) The same conditions were as described, except that 30 cycles were used.	Massung et al., 1998
<i>Ehrlichia</i> spp. (n-PCR)	16S rRNA	ECC AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC ECB CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA HE3 TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT ECAN5 CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	396	1°) 94°C 3 min, 30 cycles 94°C 1 min, 65°C 2 min, 72°C 2 min. 2°) 3 cycles 94°C 1 min, 55°C 2 min, 72°C 1.5 min.	Murphy et al., 1998
<i>Ehrlichia</i> spp. (qPCR)	dsb	321 TTGCAAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA 671 GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA PROBE FAM AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA BHQ-1	409	95°C 5 min, 40 cycles 95°C 15 sec, 60°C 1 min.	Doyle et al., 2005
<i>Bartonella</i> spp. (qPCR)	nuoG	F-Bart CAATCTCTTTTGGCTTCACC R-Bart TCAGGGCTTTATGTGAATAC PROBE TEXAS RED TTYGTCATTTGAACACG BHQ2a-Q	93	95°C 3 min, 40 cycles 95°C 10 min, 52,8°C 30 sec.	André et al., 2015

Table 2:

Results of the blood smear, ELISA and PCR according to the type of procedure.

Animals	Procedure		Blood Smear	Diagnosis	
	Elective	Routine		ELISA <i>B. canis</i> e <i>E. canis</i>	PCR
Dog 52		X	N	1	<i>Anaplasma</i> spp.
Dog 69		X	N	0	<i>Hepatozoon</i> spp.
Dog 86	X		N	1	<i>B. vogeli</i>
Dog 94	X		N	1	<i>B. vogeli</i>
Dog 98		X	Piroplasms	1	<i>R. vitalli</i>
Dog 102	X		N	0	<i>B. vogeli</i>
Dog 106		X	Piroplasms	2	<i>R. vitalli</i>
Dog 107		X	Piroplasms	2	<i>R. vitalli</i>
Dog 108		X	Piroplasms	1	<i>R. vitalli</i>
Dog 109		X	Piroplasms	1	<i>R. vitalli</i>
Dog 110		X	Piroplasms	1	<i>R. vitalli</i>
Cat 31		X	N	-	<i>Bartonella</i> spp.
Cat 71	X		N	-	<i>Bartonella</i> spp.
Cat 72	X		N	-	<i>Bartonella</i> spp.
Cat 73	X		N	-	<i>B. vogeli</i>
Cat 74	X		N	-	<i>Bartonella</i> spp.
Cat 82	X		N	-	<i>Bartonella</i> spp.
Cat 84	X		N	-	<i>Bartonella</i> spp.
Cat 100	X		N	-	<i>Babesia</i> <i>vogeli</i>

N, negative; 0, negative; 1, anti-*B. canis* antibody; 2, anti-*B. canis* e *E. canis* antibody.

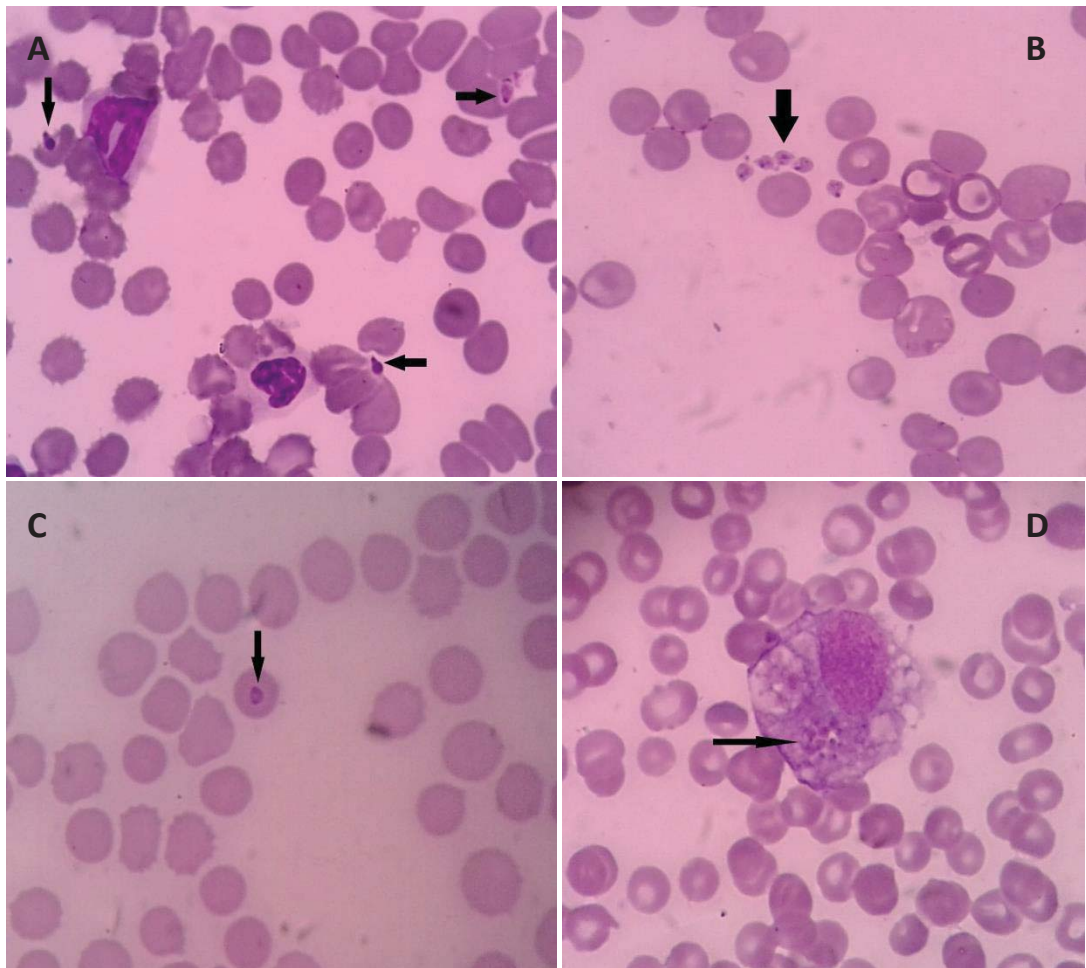


Fig. 1. Parasitic forms of *Rangelia vitalli* intra and extracellular in naturally infected dogs in this study. A and C: piroplasms intraerythrocytic (arrows) (A - Panotic and C - Giemsa). B: extracellular piroplasms (arrow) (Panotic). D: piroplasms within a macrophage (arrow) (Panotic) (1000X).

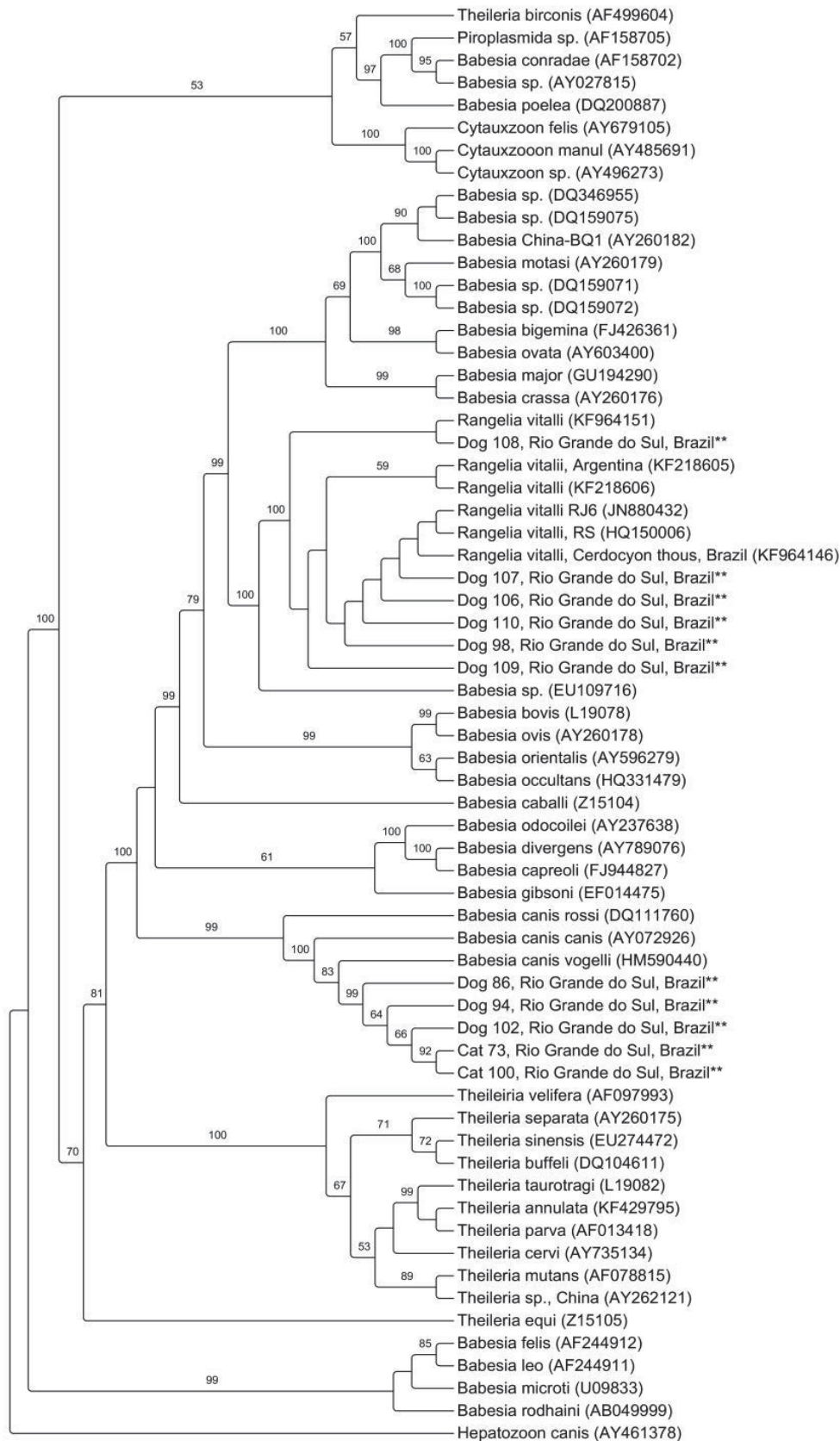


Fig. 2: Phylogenetic tree of piroplasmids (*Babesia* spp., *Cytauxzoon* sp., *Theileria* spp. and *Rangelia vitalli*) (18SrRNA) based on and maximum likelihood, using a GTRGAMMA model of evolution. Numbers correspond to bootstrap values over 50. **Samples from the present study

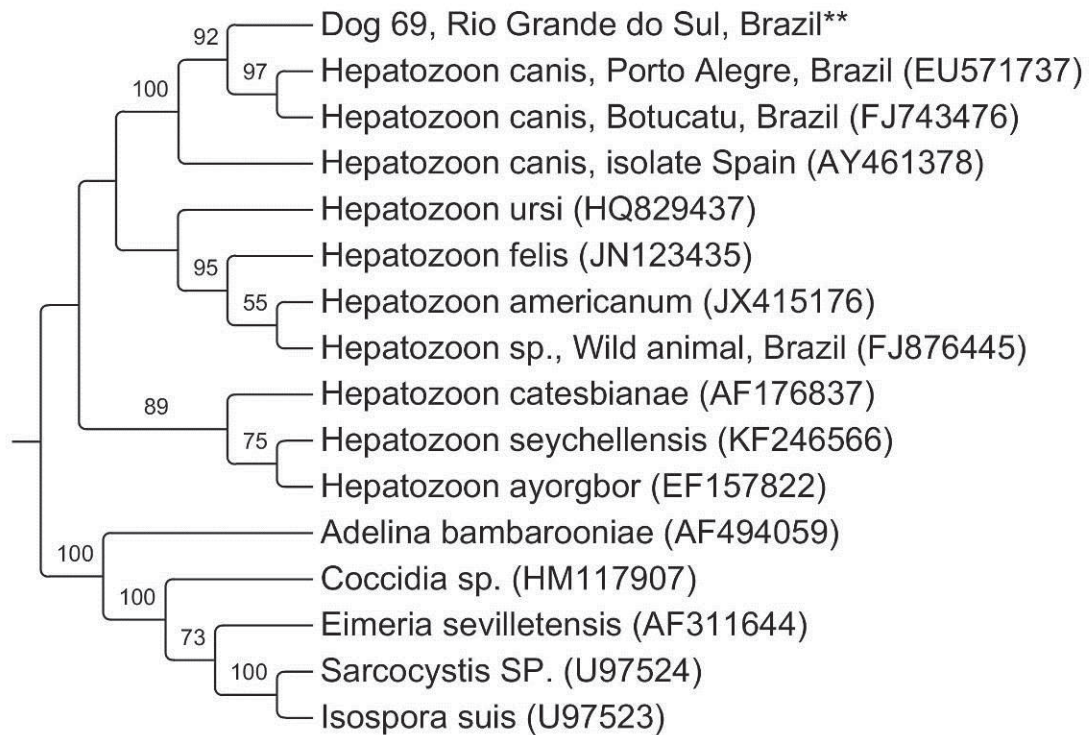


Fig. 3. Phylogenetic tree of *Hepatozoon* spp. (*18SrRNA*) based on and maximum likelihood, using a GTRGAMMA model of evolution. Numbers correspond to bootstrap values over 50.

**Sample from the present study

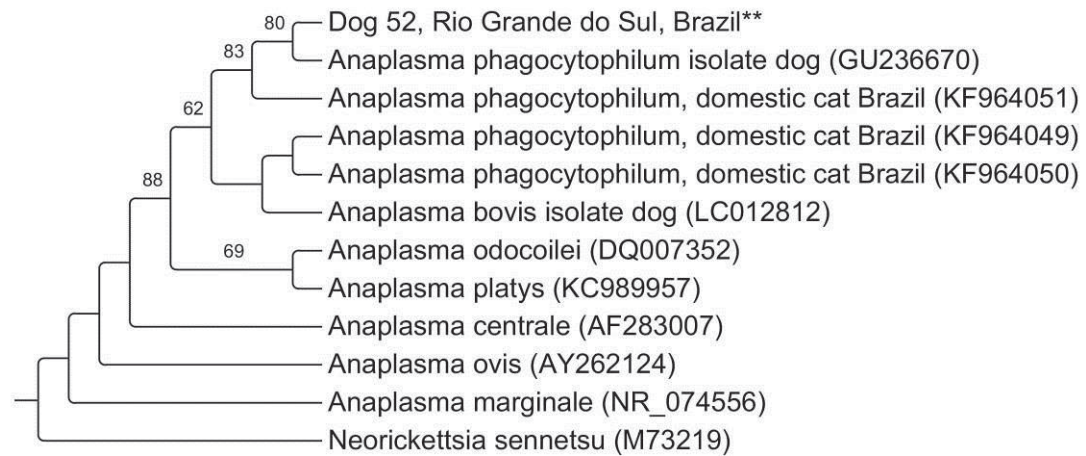


Fig. 4: Phylogenetic tree of *Anaplasma* spp. (*16SrRNA*) based on and maximum likelihood, using a GTRGAMMA model of evolution. Numbers correspond to bootstrap values over 50.

**Sample from the present study

2 CONCLUSÕES

A ocorrência de agentes transmitidos por vetores que infectam cães e gatos domésticos representa um importante passo para a determinação da epidemiologia das doenças vetoriais no Estado do RS, visto que, poucos estudos tem abordado a pesquisa epidemiológica básica, a fim de se ter conhecimento sobre quais são os agentes que circulam em vetores ártropodes e quais destes estão sendo transmitidos para os pequenos animais nesta região do Brasil. Com este estudo e com os resultados obtidos podemos concluir que:

- a) O agente *B. vogeli* nunca descrito no RS em cães e gatos domésticos, pode ser considerados potenciais patógenos de pequenos animais nesta região.
- b) Os agentes *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. e *Bartonella* spp., já relatados em outras regiões do RS, mas descritos pela primeira vez na região Noroeste do RS, também podem ser considerados potenciais patógenos de pequenos animais e, mais ainda, de seres humanos, visto que ambos os agentes possuem carácter zoonótico.
- c) *R. vitalii* parece surgir como um patógeno re-emergente à despeito das cinco décadas em que foi erroneamente identificado como sendo outros agentes. Além disso, demonstra ser um dos patógenos mais frequentes do nosso Estado, diferindo das demais regiões do país.
- d) *E. canis* não foi detectada no presente estudo e, até o presente momento, não existem informações sobre este agente no RS. Desta forma, sugere-se atribuir essa não ocorrência à diferente linhagem de *R. sanguineus s.l.* encontrada no RS.
- e) Sugere-se que os animais avaliados quanto à presença de anticorpos frente à *B. vogeli* e *E. canis* encontravam-se em fase crônica ou subclínica da doença, uma vez que, os resultados obtidos pela PCR não foram positivos na mesma proporção. Além disso, sugerimos que reações cruzadas também possam ter ocorrido com agentes da família Anaplasmataceae, no caso da detecção de AC anti-*E. canis*, e outros piroplasmídeos, no caso da detecção de AC anti-*B.vogeli*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças vetoriais são enfermidades distribuídas por todo o mundo e atingem uma vasta gama de hospedeiros. As transformações climáticas, a presença de animais selvagens em ambientes urbanos e vice-e-versa, o aumento no número de cães e gatos em residências e, conseqüentemente, a proximidade de seres humanos a estes animais, o transporte de animais por todo o mundo, as condições sanitárias precárias, são alguns dos fatores que têm contribuído para o aumento em nível mundial da ocorrência de infecções por agentes de doenças transmitidas por vetores em animais e seres humanos.

Neste contexto, existe atualmente a necessidade de pesquisas epidemiológicas voltadas para a identificação destes agentes. Através da identificação das doenças existentes nas mais diversas regiões do mundo, outros caminhos se abrem para investimentos em pesquisas voltadas à identificação de vetores, competência vetorial, diversidades antigênicas dos patógenos, produção de vacinas, cujos resultados podem ajudar a esclarecer as perguntas que cercam o mundo da parasitologia. Além disso, estas pesquisas acabam por contribuir diretamente na prática clínica, pois fornecem subsídios para investimentos em diagnósticos sensíveis e específicos, que por sua vez, refletirão em uma conduta terapêutica correta.

A partir deste estudo, e, diante do exposto acima, tem-se como perspectivas futuras a realização de trabalhos com felinos domésticos, pois neste estudo obtivemos um pequeno número de animais e também muito pouco se sabe sobre os agentes que estes albergam e, conseqüentemente, transmitem. Além disso, espera-se trabalhar com vetores, principalmente carrapatos, para se determinar quais patógenos estes estão realmente transmitindo e, mais especificamente, determinar a competência vetorial de *R. sanguineus s.l.* frente à alguns patógenos como *Babesia*. Estudos voltados para a detecção de agentes de doenças transmitidas por vetores em seres humanos também poderão ser contemplados, a fim de, no futuro, podermos ter um quadro epidemiológico destas enfermidades bem esclarecido em nosso meio, e podermos atuar de forma concreta em políticas de saúde pública.

4 REFERÊNCIAS

1. Fourie JJ, Luus HG, Stanneck D, Jongejan F. The efficacy of Advantix_® to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite*. 2013 Jun;20(36):1-7.
2. Vilhena H, Díaz VLM, Cardoso L, Vieira L, Altet L, Francino O, et al. Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*. 2013;6(99):1-6.
3. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (POR). Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; 2014.
4. Figuera RA, Souza TM, Kommers GG, Irigoyen LF, Barros CSL. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesq Vet Bras*. 2010 Nov;30(11):974-987.
5. Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. Babesia: a world emerging. *Inf Genetics Evolution*. 2012;12:1788-1809.
6. Aydin MF, Sevin F, Sevin M. Molecular detection and characterization of *Hepatozoon* spp. in dogs from the central part of Turkey. *Ticks and Tick-borne Dis*. 2015;6:388-392.
7. Mogollon-Pasapera E, Otvos Jr L, Giordano A, Cassone M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? *Int J Inf Dis*. 2009;13:3-8.
8. Chomel BB, Kasten RW, Stuckey MJ, Bretschwerdt EB, Maggi RG, Henn JB et al. Experimental infection of cats with *Afipia felis* and various *Bartonella* species or subspecies. *Vet Microbiol* 2014;172(2014):505-510.
9. Aktas M, Özübek S, Altay K, Ipek NDS, Balkaya I, Utuk AE et al. Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites & Vectors*. 2015;8:157.
10. Kaewkong W, Intapan PM, Sanpool O, Janwan P, Thanchomnang T, Kongklieng A et al. High throughput pyrosequencing technology for molecular differential detection of *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in canine blood samples. *Ticks Tick-borne Dis*. 2014;5:381-385.
11. Maia C, Almeida B, Coimbra M, Fernandes MC, Cristovão JM, Ramos C et al. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*. 2015;8:138.
12. França RT, Silva AS, Loretto AP, Mazzanti CM, Lopes STA. Canine rangeliellosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current Day – A review. *Ticks Tick-borne Dis*. 2014 Jun;5(2014):466-474.

13. Eiras DF, Craviotto MB, Baneth G, Moré G. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. *Parasitol Int.* 2014 Jun 23; 63(2014):729-734.
14. Sarasúa LM, Donati NR. Constatación de babesiosis canina em el depto de Artigas (Uruguay). *Veterinaria.* 1976;(62):137-139.
15. Soares JF, Dall’Agnol B, Costa FB, Krawczaka FS, Comerlatoc AT, Rossatod BCD. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet Parasitol.* 2014;202(2014):156-163.
16. Solano-Gallego, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol.* 2011 Set 8;181(1):48-60.
17. Dantas-Torres F, Otranto D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the Black box. *Parasites & Vectors.* 2014;7:22.
18. Passos LMF, Geigerb SM, Ribeiro MFB, Pfisterb K, Zahler-Rinder M. First Molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;127:81-85.
19. Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, Jojima FS, Morais HSA. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Vet Parasitol.* 2006;141:177-180.
20. Rotondano TEF, Almeida HKA, Krawczak FS, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB et al. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Braz. J Vet Parasitol.* 2015 Jan-Mar;24(1):52-58.
21. Aktas M, Özübek S, Altay K, Balkaya I, Utuk A, Kirbas A et al. A molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in domestic dogs in Turkey. *Vet Parasitol.* 2015;209:264-267.
22. Valle LJ, Flores L, Vargas M, Garcia-de-la-Guarda R, Quispe RL, Ibanez ZB. *Bartonella bacilliformis*, endemic pathogen of the Andean region, is intrinsically resistant to quinolones. *Int J Inf Dis.* 2010;14(2010):506–510.
23. Chamberlin J, Laughlin LW, Romero S, Solórzano N, Gordon Scott, Andre RG et al. Epidemiology of Endemic *Bartonella bacilliformis*: A Prospective Cohort Study in a Peruvian Mountain Valley Community. *JID.* 2002 Out 1;186:983-990.
24. Bortoli CP, André MR, Pinto AA, Machado STZ, Machado RZ. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012 Jul-Set;21(3):219-223.
25. Jafarbekloo A, Bashshi H, Faghihi F, Telmadarray Z, Khazeni A, Oshaghi MA et al. Molecular Detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* Infection in Ticks in Borderline of Iran-Afghanistan. *J. Biomedical Science Engineering.* 2014; 7:919-926.

26. Hii SF, Traub RJ, Thompson MF, Henning J, O'Leary CA, Burleigh A et al. Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne diseases in northern Australia. *Australian Vet J.* 2015 Mar;93(3):58-66.
27. Duscher GG, Leschnik M, Fuehrer HP, Joachim A. Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *Int. J. Parasitol: Parasites Wildlife.* 2015;4:88-96.
28. Carini A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. *Rev Med.* 1908 Dez 7; 22:459-465.
29. Pestana BR. O nambyuvú. *Rev Med.* 1910;22:423-426.
30. Carini A, Maciel J. Sobre a moléstia dos cães chamada nambi-uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalli*). *An Paul Med Cirurg.* 1914;3(2): 65-71.
31. Paraense WL, Vianna YL, Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. 1948. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1948;46:595-603.
32. Krauspenhar C, Figuera RA, Graça DL. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. *Medvop – Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim.* 2003 Out-Dez;1(4):273-281.
33. Piana GP, Galli-Valerio B. Su di un'infezione Del cane com parassiti endoglobulari nel sangue. *Nota Preventiva, II Moderno Zooiatro.* 1895;6:163-169.
34. El-Dakhly KM, Goto M, Noishiki K, El-Nahass E, Hirata A, Sakai H et al. Prevalence and diversity of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs in Japanese islands and penínsulas. *Parasitol Res.* 2013;112:3267-3274.
35. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VAJ. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microb.* 2011;301(2011):7-15.
36. Salinas-Meléndez JÁ, Villavicencio-Pedraza R, Tamez-Hernández BV, Hernández-Escareño JJ, Avalos-Ramírez R, Zarate-Ramos JJ. Prevalence of anti-*Anaplasma phagocytophilum* antibodies among dogs from Monterrey, Mexico. *Afr J Microbiol Res.* 2014 Fev 19;8(8):825-829.
37. Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J Inf Dis.* 1978;137:182-8.
38. Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol.* 1996;34:44-48.
39. Meng QL, Qiao J, Chen CF, Cai XP, Wang GC, Zhang ZC et al. A preliminary survey on the ticks carrying *Ehrlichia* and *Anaplasma* in the Southern marginal zone of Gurbantunggut Desert. *Afr J Microbiol.* 2012 Nov 13;6(43):7073-7077.

40. Huxsoll DL, Hildebrandt PK, Nims RM, Walker JS. Tropical canine pancytopenia. J American Vet Med Association. 1970, 157(11):1627-1632.
41. Corales JM, Vilorio VV, Venturina VM, Mingala CN. The prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs in Nueva Ecija, Philippines based on multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay. A Parasitol. 2014;60(4):267-272.
42. World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. World Health Organization; 2014.
43. Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FR, Guedes Jr DS, Souza IIF, Ono TM, et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. Rev Bras Parasitol Vet. 2009 Dez;18(1):58-62.
44. Lemos TD, Cerqueira AMF, Tomas HK, Silva AV, Corrêa RGB, Paludo GR. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2012 Abr-Jun;21(2):137-142.
45. Costa MM, França RT, Silva AS, Paim CB, Paim F, Amaral CH. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. Rev Parasitol Vet. 2012 Jul-Jun; 21(3):243-248.
46. Loretto AP, Barros SS. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. Vet Parasitol. 2005;134(2005):193-213.
47. Loretto AP, Barros SS. Infecção por *Rangelia vitalii* (“nambiuú”, peste do sangue”) em caninos: Revisão. Medvet – Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim. 2004;2(6):128-144.
48. Braga JFV, Silva SMMS. Babesiose canina: uma visão geral da doença. Rev Ciencias Agroveter. 2013;12(2):204-213.
49. Baneth G, Kenny MJ, Tasker S, Anug Yigal, Shkap V, Levy A, Shaw S. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subs. *presentii*, in domestic cats. J Microbiol. 2004 Jan;42(1):99-105.
50. Michel AO, Mathis A, Ryser-Degiorgis MP. *Babesia* spp. in European wild ruminant species: parasite diversity and risk factors for infection. Vet Res. 2014;45:65.
51. Miró G, Checa R, Papparini A, Ortega N, González-Fraga JL, Gofton A et al. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. Parasites & Vectors. 2015;8:217.
52. Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasites & Vectors. 2009;2(1):S4.

53. Sumrandeea C, Baimaia V, Trinachartvanita W, Ahantarig A. *Hepatozoon* and *Theileria* species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand. *Ticks Tick-borne Dis.* 2015;6:309–315.
54. Lee GKC, Ignace JAE, Robertson ID, Irwin PJ. Canine vector-borne infections in Mauritius. *Parasites & Vectors.* 2015;8:174.
55. Demoner LC, Rubini AS, Paduan KS, Metzger B, Antunes JMAP, Martins TF et al. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks Tick-borne Dis.* 2013;4:542-546.
56. Duscher GG, Leschnik M, Fuehrer HP, Joachim A. Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *Int. J. Parasitol: Parasites and Wildlife.* 2015;4:88-96.
57. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Applied Microbiol.* 2010;109(2010):743-750.
58. Yao C, Zhu C, Pan X, Hua X, Yuan C. A review of the prevalence of emerging Bartonellosis in humans and animals in China. *Afr J Microbiol Res.* 2011 Nov 9; 5(25):4248-4252.
59. Staggemeier R, Venker CA, Klein DH, Petry M, Spilki FR, Cantarelli VV. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):873-878.
60. Telford SR, Wormser GP. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. *Emerging Infectious Dis* [internet]. 2010 [acesso em 2015 mar 06];16(3):379-384. Disponível em: www.cdc.gov/eid
61. Pennisi MG, Marsilio F, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S. *Bartonella* species infection in cats – ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med and Surgery.* 2013;15:563–569.
62. Velho PENF, Souza SEM, Cintra ML, Moraes AM, Uthida-Tanaka AM. Diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp.: a propósito de um caso de angiomatose bacilar. *An Bras Dermatol.* 2006;81(4):349-53.
63. Kline K, McCarthy JS, Pearson M, Loukas A, Hotez PJ. Neglected Tropical Diseases of Oceania: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control. *PLOS Neglected Tropical Dis.* [internet]. 2013 [acesso em 2015 mar 19];7(1):e1755. Disponível em: www.plosntds.org
64. Santos HA, Thomé SM, Baldani CD, Peixoto MP, Pires MS. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie,1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & Vectors.* 2013 Dez 11,6:348.

65. Dahmani M, Marié JL, Mediannikov O, Raoult D, Davoust B. First Identification of *Anaplasma platys* in the Blood of Dogs from French Guiana. *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 2015;15(2):170-172.
66. Cardoso L, Gilad M, Cortes HCE, Nachum-Biala Y, Lopes AP, Vila-Voçosa MJ et al. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasites & Vectors.* 2015;8:144.
67. Tommasi AS, Baneth G, Breitschwerdt EB, Stanneck D, Dantas-Torres F, Otranto D et al. *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun;52(6):2231-2234.
68. Gaunt SD, Beall MJ, Sillman BA, Lorentzen L, Diniz PPVP, Chandrasheka R et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors.* 2010;3:33.
69. Ramos CAN, Ramos RAN, Arújo FR, Guedes DSJ, Souza IIF, Ono TM et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009 Dez;18(1):58-62.
70. Vieira RF da C, Biondo AW, Guimaraes AMS, dos Santos AP, dos Santos RP, Dutra LH. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(1):1-12.
71. Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim.* 2010;40:1121–1140.
72. Loretto AP, Barros SS. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães (“nambiuú”, “peste de sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. *Arq Inst Biol.* 2004 jan-mar;71(1):101-131.
73. Moreira MVL, Guimarães LB, Silva JF, Ocarino NM, Serakides R, Ecco Roselene. Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. *Archives Vet Science.* 2013;18(2)237-239.
74. Simking P, Wongnakphet S, Stich RW, Jittapalapong S. Detection of *Babesia vogeli* in stray cats of metropolitan Bangkok, Thailand. *Vet Parasitol.* 2010, 173:70-75.
75. André MR, Denardi NCB, de Souza KCM, Gonçalves LR, Henrique PC, Ontivero CRGR et. al. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick-borne Dis.* 2014;5:545-551.
76. André MR, Adania CH, Teixeira RHF, Allegretti SM, Machado RZ. Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in brazilian zoos. *J Zoo Wildlife Med.* 2011;42(1):139-143.
77. Miranda RL, O’Dwyer LH, Castro JR, Metzger B, Rubini AS, Mundim AV et al. Prevalence and molecular characterization os *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. *Res Vet Science.* 2014;97:326-329.

78. Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliari KM, Yoshinari NH. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;163:357-361.
79. Rubini, A.S., Paduan, K. dos S., Cavalcante, G.G., Ribolla, P.E.M., O'Dwyer, L.H. 2005. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitol Res.* 97, 91-93.
80. Miranda, R.L., O'Dwyer, L.H., de Castro, J.R., Metzger, C.B., Rubini, A.S., Wundim, A.V., Eyal, O., Talmi-Frank, D., Cury, M.C., Baneth, G. 2014. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in southeast Brazil. *Res Vet Science.* 97, 326-329.
81. Souza AM, Almeida DNP, Guterres A, Gomes R, Favacho ARM, Moreira NS et al. Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro – Brasil. *R Bras Ci Vet.* 2010 Jan-Abr;17(1):7-11.
82. Beugnet F, Marie JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol.* 2009;163:298-305.
83. Abarca K, López J, Perret C, Guerrero J, Godoy P, Veloz A. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerging Inf Dis.* [internet]. 2007 Set [acesso em 2015 abr 23];13(9):1392-1395. Disponível em: www.cdc.gov/eid
84. Little SE, Beall MJ, Bowman DD, Chandrashekar R, Stamaris J. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010-2012. *Parasites & Vectors.* 2014. 7:257.
85. Lasta CS, dos Santos AP, Messick JB, Oliveira ST, Biondo AW, Vieira RFC et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013, 22(3):360-366.
86. Krawczac FS, Labruna MB, Sangioni LA, Vogel FSF, Soares JF, Lopes STA. Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Parasitol Vet.* 2012 Out-Dez; 21(4):415-417.
87. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Vet J.* 2011 Mar;187(3):292–296.
88. Zanette MF, Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013.
89. Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ. PRC-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet Parasitol.* 2007;144:20-27.

90. Soares JF, Girotto A, Brandão PE, Da Silva AS, França RT, Lopes STA et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;180(2011):203-208.
91. Tanikawa A, Labruna MB, Costa A, Aguiar DM, Justiniano SV, Mendes RS et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Res Vet Science.* 2013 Jun;94(3):474-477.
92. Vidotto O, Trapp SM. Babesiose canina. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2004;13:58-61.
93. Consejo Europeo para el Control de las parasitosis de los animales de compañía. Ectoparásitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos. ESCCAP [internet]. 2009 [acceso em 2015 mar 16]; Disponível em: http://www.esccap.org/uploads/docs/22hejwfj_esguian3_ectoparasitos_altausb.pdf
94. Braga JFV, Silva SMMS. Babesiose canina: uma visão geral da doença. *Rev Ci Agrovet.* 2013;12(2):204-213.
95. Cruz AC, Zweygarth E, Ribeiro MFB, da Silveira JAG, Fuente J, Grubhoffer L. New species of *Ehrlichia* isolated from Rhipicephalus (Boophilus) microplus shows a ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasites & Vectors.* 2012;5:291.

APÊNDICES

FIGURAS

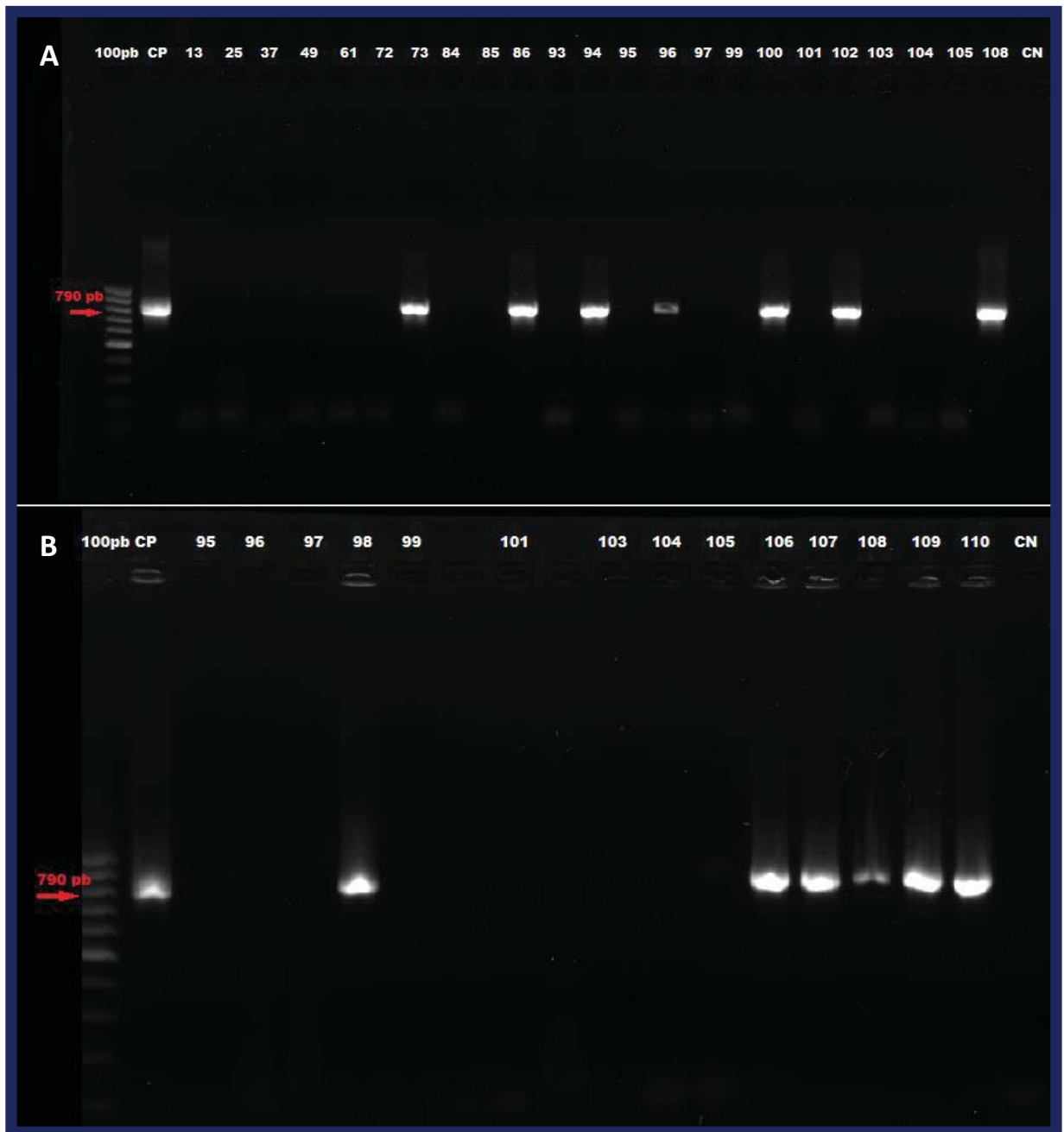


Fig. 1: Eletroforese em gel de agarose 1%. nPCR do gene 18S rRNA de *Babesia* spp. CP de *B. canis* obtido através de cão experimentalmente infectado. CN com água ultra-pura esterilizada. A: amostras 73, 86, 94, 96, 100, 102 e 108* positivas. B: amostras 98, 106, 107, 108, 109 e 110 positivas. As demais amostras foram todas negativas. pb: Pares de Base. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo.*Amostra 108 foi repetida.

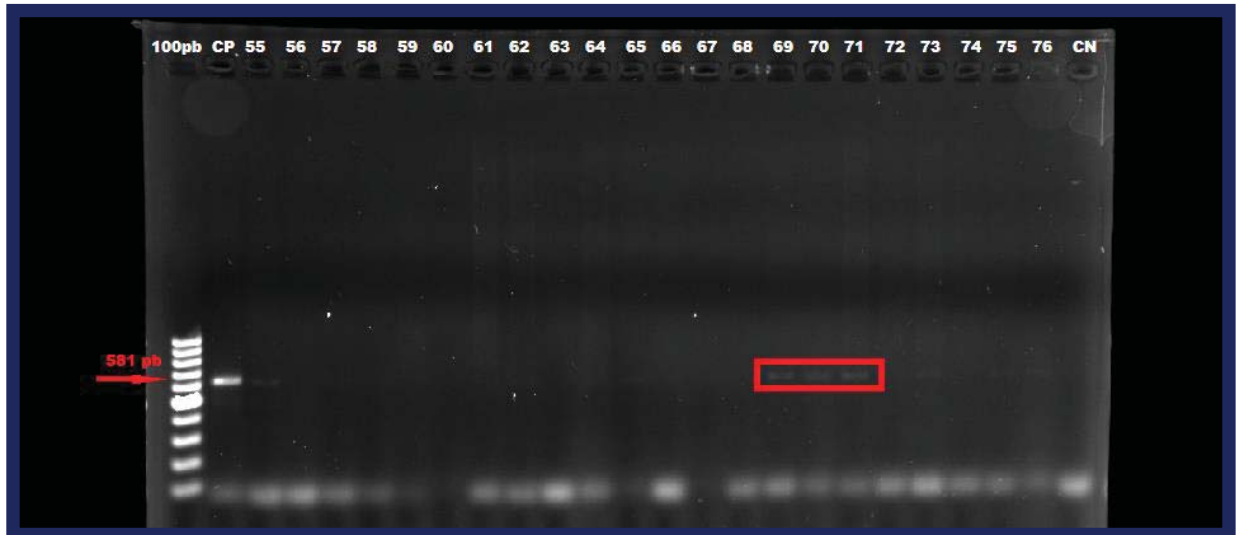


Fig. 2: Eletroforese em gel de agarose 1%. PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. CP de *Hepatozoon* spp. obtido de canídeo selvagem naturalmente infectado. CN com água ultra-pura esterilizada. Amostras 69, 70 e 71 positivas, porém somente a amostra 69 foi possível ser sequenciada. As demais amostras foram todas negativas. pb: Pares de Base. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo.

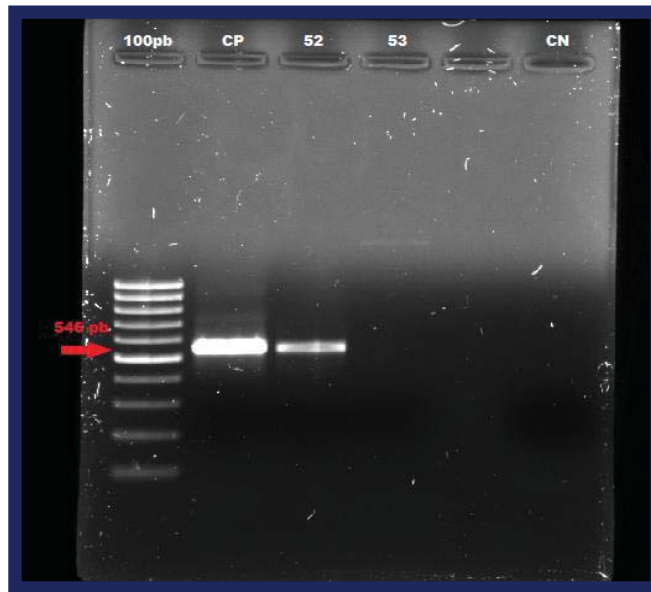


Fig. 3: Eletroforese em gel de agarose 1%. nPCR do gene 16S rRNA de *Anaplasma* spp. CP de *Anaplasma* spp. obtido de cão naturalmente infectado. CN com água ultra-pura esterilizada. Amostra 52 positiva. Amostra 53 negativa. pb: Pares de base. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo

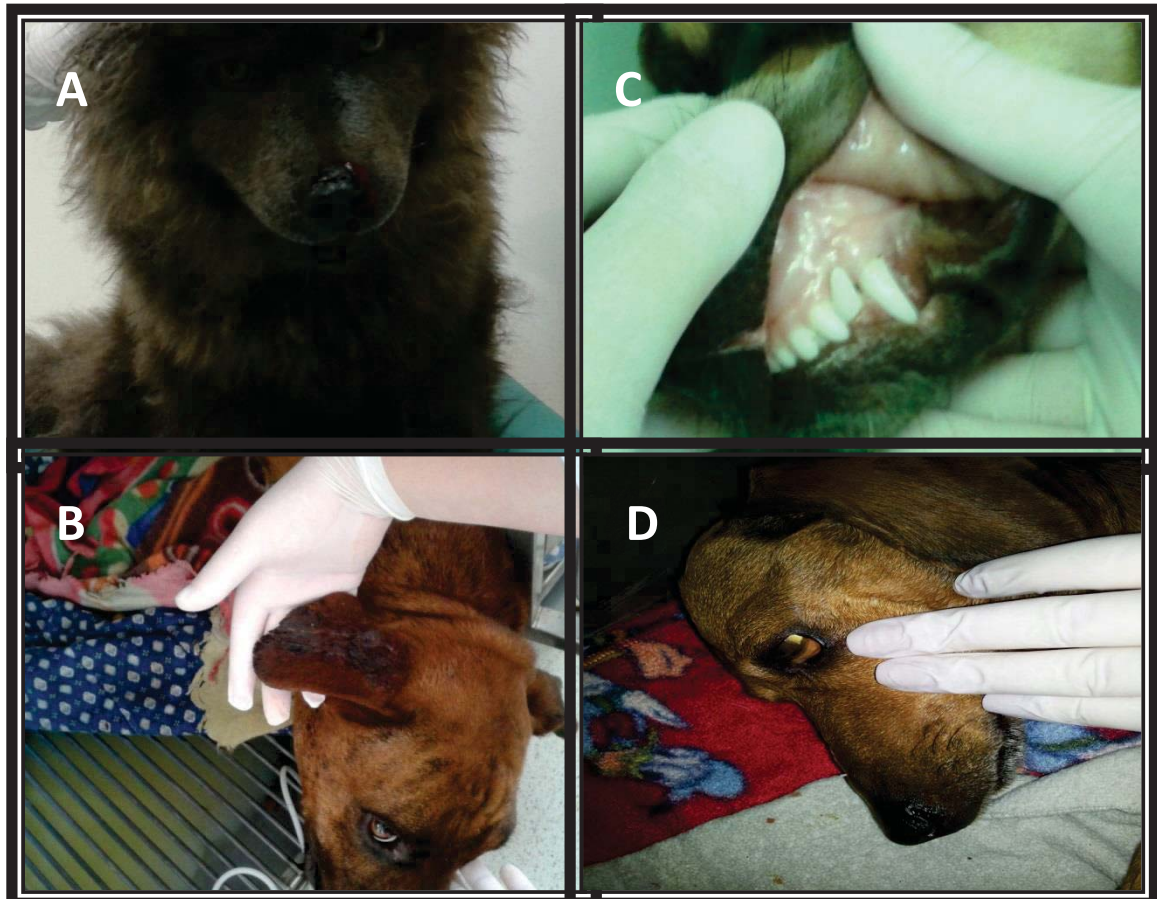


Figura 4: Sinais clínicos de cães naturalmente infectados neste estudo com *R. vitalii*: A: Hemorragia nasal. B: Hemorragia auricular. C: Mucosa oral pálida. D: Mucosa ocular icterica. *As quatro imagens correspondem a quatro diferentes animais infectados.