

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

***Babesia canis, Ehrlichia canis E Rangelia vitalii*: ASPECTOS  
CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS, HEMATO-SOROLÓGICOS E  
MOLECULARES DE CÃES INFECTADOS DA REGIÃO DE PASSO  
FUNDO-RS-BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Juliana Gottlieb**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2014**

***Babesia canis*, *Ehrlichia canis* E *Rangelia vitalii*: ASPECTOS CLÍNICOS,  
PARASITOLÓGICOS, HEMATO-SOROLÓGICOS E MOLECULARES DE  
CÃES INFECTADOS DA REGIÃO DE PASSO FUNDO-RS-BRASIL**

**Juliana Gottlieb**

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**

**Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2014**

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

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

*Babesia canis, Ehrlichia canis, Anaplasma platys e Rangelia vitalii*: ASPECTOS  
CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS, HEMATO-SOROLÓGICOS E MOLECULARES  
DE CÃES INFECTADOS DA REGIÃO DE PASSO FUNDO-RS-BRASIL.


Elaborada por  
**Juliana Gottlieb**

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

Comissão Examinadora

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

  
Luiz Carlos Krenz, PhD, UPF

  
José Reek Júnior, Dr., IPVDF

Passo Fundo, RS, Brasil  
2014

CIP – Catalogação na Publicação

---

G686b Gottlieb, Juliana  
Babesia canis, Ehrlichia canis e Rangelia vitalii : aspectos clínicos, parasitológicos, hemato-sorológicos e moleculares de cães infectados da região de Passo Fundo-RS-Brasil / Juliana Gottlieb. – 2014.  
46 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira.  
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –  
Universidade de Passo Fundo, 2014.

1. Cão - Doenças - Passo Fundo (RS). 2. Parasitologia.  
I. Vieira, Maria Isabel Botelho, orientadora. II. Título.

CDU: 636.7

---

Catálogo: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu noivo Maicon; amor, companheirismo, amizade, carinho, respeito são algumas palavras que descrevem o amor verdadeiro.

Aos meus pais Néri e Sérgio, por todo exemplo, dedicação e carinho aos filhos.

Aos meus irmãos, Manuela e Álvaro, meus melhores amigos e pessoas especiais com eu convivo.

A minha orientadora, professora Maria Isabel Botelho Vieira, pelos esforços contínuos para que tudo desse certo, pelo aprendizado e pelos incentivos constantes durante o mestrado.

A todos os meus amigos, obrigada. Toda a torcida e carinho foram muito importantes.

Aos graduandos, mestrandos e doutorandos da Unesp/Jaboticabal, em especial a professora Rosângela Zacarias Machado e ao professor Célio Machado, pela generosidade, sabedoria e hospitalidade durante a minha estada em São Paulo.

Aos meus colegas de mestrado e aos professores do programa em Bioexperimentação, todos foram corajosos e bem sucedidos nesta jornada que está apenas começando.

A todos os profissionais e alunos do HV-UPF que de alguma forma contribuíram para a finalização deste projeto.

Ao professor Márcio Machado Costa, muito obrigada pela presteza e colaboração no desenvolvimento do artigo.

Ao professor Adriano Pasqualotti, pela colaboração na confecção do artigo e pela disponibilidade em todos os momentos.

A FAPERGS e a Universidade de Passo Fundo, pela bolsa de estudos durante o mestrado, sem ela nada seria possível.

A meus animais de estimação, que me amam incondicionalmente e me lembram do motivo, diariamente, pelo qual estou aqui hoje.

**EPÍGRAFE**

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”  
Érico Veríssimo

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	<b>viii</b>
LISTA DE ABREVIATURAS .....	<b>ix</b>
RESUMO .....	<b>x</b>
ABSTRACT .....	<b>xi</b>
1. INTRODUÇÃO .....	<b>12</b>
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	<b>14</b>
2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS .....	14
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	15
2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS .....	15
2.4 DIAGNÓSTICO .....	17
<b>2.4.1 Hematológico .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2 Parasitológico .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.3 Testes sorológicos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.4 Diagnóstico molecular .....</b>	<b>20</b>
<b>3. CAPÍTULO 1. Caracterização molecular de <i>E. canis</i> e <i>R. vitalii</i> no Sul do Brasil.....</b>	<b>22</b>
Abstract .....	23
1. Introduction .....	24
2. Material and Methods.....	25
2.1 Experimental animals.....	25
2.2 Molecular analysis .....	25
2.3 Phylogenetic analysis .....	26
3. Results and Discussion.....	27
4. Conclusion.....	32
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>38</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Protozoários do gênero *Rangelia vitalii* livres no plasma sanguíneo e no citoplasma de célula mononuclear em um cão.

FIGURA 2. Exame sorológico (RIFI) positivo para *Ehrlichia canis*.

FIGURA 3. Exame sorológico (RIFI) positivo para *Babesia canis*.

FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose mostrando os resultados da PCR para a detecção do gene Dsb de *Ehrlichia canis*. Coluna 1: marcador de pares de base (pb) 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); Coluna 2: controle positivo; Coluna 12: cão positivo para *E. canis* (seta); Coluna 17: controle negativo.

FIGURA 5. Árvore filogenética baseada em sequências de *Ehrlichia* spp. dirigida para o gene dsb. A árvore foi obtida por meio do método de *Maximum-likelihood* utilizando a facilitate CIPRES ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). Os valores de bootstrap menores que 60 não são mostrados. *R. prowazekii* e *R. rickettsii* foram utilizadas como (*outgroup*).

FIGURA 6. Árvore filogenética baseada em sequências de *Rangelia vitalii* dirigida para o gene 18S de rRNA. A árvore foi obtida por meio do método de *Maximum-likelihood* de acordo com a menor pontuação do parâmetro BIC (Bayesian Information Criterion). *Hepatozoon canis* foi utilizada como (*outgroup*).

### 3. CAPÍTULO 1

FIGURE 1. Phylogenetic tree based on *Ehrlichia* spp. sequences directed to the dsb gene. The tree was created by means of the Maximum likelihood method using the CIPRES facility ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). Bootstrap values below 60 are not shown. *R. prowazekii* and *R. rickettsii* were used as outgroups.

FIGURE 2. Phylogenetic tree based on sequences of *Rangelia vitalii* directed to the 18S rRNA gene. The tree was obtained by the Maximum Likelihood method, based on the lowest score of the parameter BIC (Bayesian Information Criterion). *Hepatozoon canis* was used as outgroup.



**LISTA DE ABREVIATURAS**

HV-UPF	Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UPF	Universidade de Passo Fundo

## RESUMO

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

***Babesia canis*, *Ehrlichia canis* E *Rangelia vitalii*: ASPECTOS CLÍNICOS,  
PARASITOLÓGICOS, HEMATO-SOROLÓGICOS E MOLECULARES DE  
CÃES INFECTADOS DA REGIÃO DE PASSO FUNDO-RS-BRASIL**

Autor: Juliana Gottlieb

Orientador: Dra. Maria Isabel Botelho Vieira

Passo Fundo, 21 de agosto de 2014

O trabalho objetivou diagnosticar os agentes causais da infecção em cães com suspeita de hemoparasitoses atendidos na rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo, RS, Brasil. Caninos com sintomatologia como depressão, anorexia e febre foram triados para o preenchimento de um questionário e, concomitantemente, tiveram amostras de sangue venoso analisadas por técnicas laboratoriais de hemograma, esfregaço de sangue periférico, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Dos 58 caninos amostrados, 3 (5,2%) e 8 (13%) foram sororeagentes pela técnica de RIFI, frente aos antígenos de *E. canis* e *B. canis*, respectivamente. Na PCR, 4 (6,8%) caninos foram positivos para *R. vitalii* e 1 (1,7%) cão foi positivo para *E. canis*. Não foi detectado pelo diagnóstico molecular positividade das amostras para *B. canis*. Os produtos da PCR foram sequenciados e o DNA encontrado de *E. canis* e *R. vitalii* mostrou similaridade genética com amostras de *E. canis* e *R. vitalii* isoladas no Brasil, com 99% de similaridade. Destaca-se a importância da primeira detecção molecular de *E. canis* em caninos da região norte do estado do Rio Grande do Sul.

**Palavras-chave:** *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Rangelia vitalii*, PCR, sorologia

**ABSTRACT**

**Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação  
Universidade de Passo Fundo**

***Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rangelia vitalii*: clinical, parasitological, hematological, serological, and molecular aspects of infected dogs from Passo Fundo, southern Brazil.**

Author: Juliana Gottlieb

Advisor: Dra. Maria Isabel Botelho Vieira

Passo Fundo, August 21, 2014.

The purpose of this study was to diagnose the causative agents of infection in dogs with suspected hemoparasites treated during the clinical routine of the Veterinary Hospital at the University of Passo Fundo, in the municipality of Passo Fundo, RS, Brazil. Dogs with depression, anorexia and fever were screened for completion of a questionnaire and had venous blood samples analyzed by complete blood count, peripheral blood smear test, indirect immunofluorescence assay (IIFA) and polymerase chain reaction (PCR). Of 58 sampled dogs, 3 (5.2%) and 8 (13.8%) were seropositive in the IIFA for the antigens against *E. canis* and *B. canis*, respectively. In PCR, 4 (6.8%) dogs were positive for *R. vitalii* and 1 (1.7%) dog was positive for *E. canis*. No dogs were positive for *B. canis* in the molecular analysis. The PCR products were sequenced and the *E. canis* and *R. vitalii* DNAs were genetically similar (99%) to *E. canis* and *R. vitalii* strains isolated in Brazil. We emphasize the importance of the first molecular detection of *E. canis* in dogs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

**Keywords:** *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Rangelia vitalii*., PCR, serology

## 1. INTRODUÇÃO

*Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. são agentes causadores de doenças emergentes (babesiose e erliquiose, respectivamente) e de distribuição mundial. São transmitidas por artrópodes como *Rhipicephalus sanguineus* e, além de cães, podem ser encontrados em outros hospedeiros, como equinos, bovinos, felinos, animais silvestres e no homem (1). *Rangelia vitalii* é o microorganismo causador da rangeliiose. A doença afeta cães e animais silvestres, tendo como vetor o carrapato *Amblyomma aureolatum* (2). *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *R. vitalii* são hemoparasitas de cães, responsáveis por sinais clínicos como anemia, icterícia, depressão, esplenomegalia, hipertermia e linfadenopatia (3).

A biologia molecular através de técnicas como a PCR permite a detecção de material genético do parasita em praticamente qualquer material biológico. A PCR e o sequenciamento das amostras positivas têm se mostrado altamente sensíveis e específicos, determinando o agente e a subespécie envolvida, sendo importante no estabelecimento de um método diagnóstico definitivo (4). A alta morbidade associada a doenças transmitidas por vetores como carrapatos vem trazendo preocupação aos criadores de cães, tanto pelo aspecto afetivo quanto pelo impacto negativo na comercialização destes animais (5). A identificação etiológica das espécies e subespécies determina a virulência, o prognóstico e a resposta às drogas, pois, cada microorganismo responde de forma diferente de acordo com a subespécie envolvida na infecção (6).

Na região norte do estado do Rio Grande do Sul, não existem dados que determinem o agente etiológico mais comumente envolvido nas infecções suspeitas.

O objetivo geral do trabalho foi:

- Diagnosticar cães suspeitos de infecção por *B. canis*, *E. canis* e *R. vitalii*.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Descrever os sinais clínicos mais frequentemente observados nos cães através da anamnese e do exame físico;
- Relatar as alterações mais comumente observadas nos exames hematológicos (hematócrito e plaquetas) e parasitológicos (esfregaço sanguíneo);

- Avaliar qualitativamente a presença de anticorpos anti *B. canis* e anti *E. canis*;
- Identificar os agentes pela técnica de PCR, utilizando primers específicos e realizar o sequenciamento de amostras positivas através do diagnóstico molecular.

A dissertação compreende, além desta introdução, uma breve revisão da literatura sobre hemoparasitoses de caninos (babesiose, ehrlichiose e rangeliose) e um capítulo na forma de artigo científico que aborda o tema: “Caracterização molecular de *E. canis* e *R. vitalii* no Sul do Brasil”. As considerações finais, conclusões e referências bibliográficas compõem a última parte da dissertação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Doenças transmitidas por vetores artrópodes são mundialmente importantes para a saúde humana e animal. Um grande número de patógenos, hospedeiros e vetores estão envolvidos com essas enfermidades e sua epidemiologia (7). Vários microorganismos são veiculados por carrapatos a cães, incluindo *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *R. vitalii* (2, 8).

### 2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS

*Ehrlichia* spp. são bactérias gram-negativas, imóveis, intracelulares obrigatórias, cocóides a elipsoidais e residentes em fagossomos. Sua transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre através do carrapato vetor, *R. sanguineus*. A classificação taxonômica do agente inclui Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, subdivisão das Proteobactérias, sendo a bactéria, quando disposta em forma de colônias, conhecida como mórula. (9).

*Babesia* spp. são protozoários intraeritrocíticos, com formato piriforme e que se multiplicam por divisão binária, preferencialmente em eritrócitos jovens (10). O agente é classificado, baseado em sua taxonomia, no Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Piroplasmorida, Família Babesiidae (11, 12). *B. canis* e *Babesia gibsoni* são os agentes etiológicos da babesiose canina (13, 14). *B. canis* tem sido subdividida em três subespécies, sendo as mesmas distintas entre si em função do vetor, patogenicidade e localização geográfica (10). *B. canis rossi* transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi* causando uma doença hemolítica severa em cães. *B. canis vogeli* transmitida pelo *R. sanguineus*, induzindo, comumente, a uma doença subclínica em cães. *B. canis canis*, transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* causando anemia hemolítica com severidade moderada (15, 16).

*R. vitalii* são protozoários que se multiplicam no citoplasma de células endoteliais, levando a um distúrbio hemolítico extravascular conhecido como rangeliose, nambi-uvú ou peste do sangue (2, 17). A classificação taxonômica do patógeno compreende o Filo Apicomplexa e a Classe Sporozoasida. A transmissão de *R. vitalii* é realizada através do carrapato do gênero *A. aureolatum* (2).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

São encontradas subespécies de *Babesia* spp. distintas na dependência da região estudada; *B. canis rossi*: no Sul da África (18) e no Sudão (19); *B. canis canis*: na Europa (4, 18, 20); e, *B. canis vogeli*: na América do Norte (18), na Europa (4, 20), no norte e sul da África (21), na Austrália (22), no Sudão (19) e na Turquia (23). No Brasil, a babesiose vem sendo descrita em muitos estados: Rio Grande do Sul (24), Rio de Janeiro (25), Pernambuco (26), Goiás (27), Distrito Federal (28), Paraná (29) e Bahia (5). No Brasil, *B. canis vogeli* (16, 30) e *B. gibsoni* (29) são as subespécies encontradas pelo diagnóstico molecular.

*Ehrlichia* spp. foi descrita pela primeira vez em cães na Argélia, em 1935 (31). No Brasil, *E. canis* foi relatada primeiramente na cidade de Belo Horizonte (32) e, atualmente, acomete aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados das regiões Nordeste, Sudeste, e Centro-Oeste (33, 34).

*R. vitalii* acomete cães domésticos e mamíferos selvagens da região sul do Brasil (2, 17, 35, 36, 37, 38, 39, 40). *R. vitalii* foi detectada por diagnóstico molecular em canídeos selvagens da espécie *Cerdocyon thous* no Rio Grande do Sul (41). A doença também foi documentada na Argentina (42) e no Uruguai (43).

## 2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

*B. canis* provoca um quadro hemolítico intravascular e extravascular, com anemia secundária (44). A hemólise intravascular decorre da adesão do piroplasma a membrana eritrocitária e a penetração na mesma por endocitose e, por consequência, a multiplicação por divisão binária sucessiva no interior da hemácia (10). O processo de reprodução assexuada do protozoário no interior de células vermelhas leva a formação de merozoítos, sendo que, hemácias podem ser parasitadas com até dezesseis merozoítos, mas a observação de um ou um par de estruturas nesta apresentação, é mais frequente (45, 46). A presença de eritrócitos parasitados por *B. canis* desencadeia uma resposta imune citotóxica mediada por anticorpos. Hemácias opsonizadas por imunoglobulinas são destruídas pelos macrófagos do baço e do fígado (sistema fagocítico mononuclear), resultando em hemólise extravascular (47, 48).

*B. canis* pode manifestar-se de quatro formas no cão: hiperaguda, aguda, subclínica e crônica (49). A forma hiperaguda da doença é incomum, mais observada

em filhotes e geralmente está associada à parasitemia intensa e a alta infestação por carrapatos. Acidose metabólica, choque, coagulação intravascular disseminada, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos são sintomas desta fase da doença. A apresentação aguda de babesiose é observada principalmente em infecções por *B. gibsoni* ou pela *B. canis rossi*. Anemia hemolítica, anorexia, esplenomegalia, febre, hematúria, icterícia, depressão, linfadenomegalia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos estão associados a esta fase. Na doença mais severa, *Babesia* spp., pode causar insuficiência renal, hepatopatia, dispneia, lesões no miocárdio e no sistema nervoso central. No Brasil, a forma subclínica da babesiose canina é provavelmente a apresentação predominante nos cães infectados (50). Previamente ao desenvolvimento da doença subclínica, os cães infectados apresentam apatia e febre transitória, recuperando-se rapidamente e tornando-se portadores do parasita. Entretanto, os portadores podem adoecer quando submetidos a estresse intenso, como por exemplo, doenças concomitantes (10).

*E. canis* infecta leucócitos e plaquetas, principalmente células mononucleares (monócitos e linfócitos). Morfologicamente, a bactéria apresenta-se em inclusões citoplasmáticas como mórulas, sendo esta a forma mais característica, corpúsculo elementar ou corpúsculos iniciais (51). A forma infectante de *Ehrlichia* spp. é o corpúsculo elementar, que penetra nas células mononucleares caninas por fagocitose. Não ocorre fusão fagolisossomal nas células infectadas e assim, os corpúsculos elementares começam a desenvolver-se no interior dos fagossomos por divisão binária (10). Após 3 a 5 dias de multiplicação do agente, ocorre à formação dos corpúsculos iniciais e, durante os próximos 7 a 12 dias, os corpúsculos iniciais se desenvolvem dando origem às mórulas (52).

*E. canis* pode manifestar-se clinicamente sob três aspectos: agudo, subclínico e crônico. A fase aguda caracteriza-se por anorexia, apatia, emaciação, hipertermia secreção óculo-nasal mucopurulenta, epistaxe, crepitação/sibilo pulmonar, dispnéia, edema de membros e escroto, insuficiência hepática, insuficiência renal, e, ainda, sinais neurológicos como convulsões e ataxia (53, 54). Os sinais clínicos de coagulopatias são raros (51). A maioria dos pacientes sobrevive à fase aguda e ingressa na fase subclínica (10). Na fase subclínica da infecção há ausência de sinais clínicos. Cães incapazes de montar uma resposta imune eficaz desenvolvem a fase crônica da doença (53). Os sintomas mais comuns da doença crônica são depressão, apatia, perda de peso crônica,



emaciação, mucosas pálidas, pneumonia, poliúria/polidipsia, estomatite, febre, edema periférico (pernas e escroto) e diáteses hemorrágicas (10). A perda de sangue geralmente é evidenciada sob a forma de epistaxe, melena, hematúria, hematêmese, hifema e hemorragia meníngea (7). Glomerulonefrite e poliartrite imunomediadas são sinais clínicos de ehrlichiose crônica. Dermatites por fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp. em cães infectados, são decorrentes da imunodepressão acarretada pelo parasito (10).

*R. vitalii* desenvolve-se no interior dos eritrócitos, leucócitos e no citoplasma de células endoteliais (17, 55). A rangeliose manifesta-se sob três formas: aguda, subclínica e crônica. Apatia, anorexia, febre, fraqueza, mucosas pálidas e/ou ictéricas espleno/hepatomegalia, vômito, diarreia, corrimento óculo-nasal mucopurulento, são sinais comuns na fase aguda da patologia (2). Um animal acometido subclínicamente, apresenta sinais clínicos análogos à fase aguda, somados a hemorragias pela boca, nariz e cutânea. Por fim, a manifestação da forma crônica de rangeliose, inclui febre intermitente (36, 56).

## 2.4 DIAGNÓSTICO

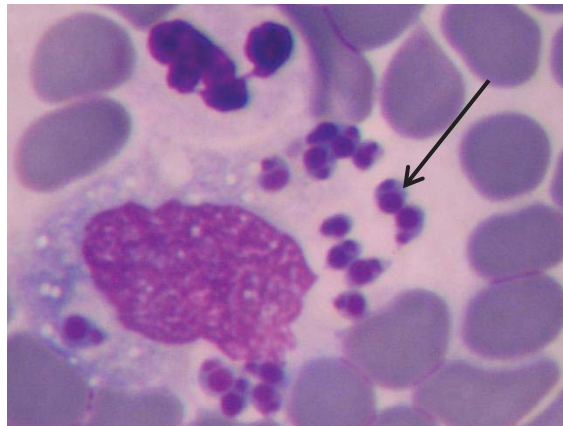
### 2.4.1 Hematológico

No que se refere ao eritrograma, anemia regenerativa (macrocítica hipocrômica), é frequentemente observada, sendo secundária ao distúrbio hemolítico intravascular e extravascular (babesiose) ou exclusivamente extravascular (rangeliose) (2, 57). Reticulocitose, esferocitose, policromasia e anisocitose são achados morfológicos concomitantes (10, 36). Trombocitopenia moderada a severa é comum na babesiose canina, independente da subespécie envolvida (45). Hemólise, vasculite, acidose e hipóxia são alguns dos fatores causais de coagulação intravascular disseminada (CID) e que esta, por sua vez, é responsável pela trombocitopenia observada (58). As alterações leucocitárias observadas nas infecções por *B. canis* não seguem um perfil específico, sendo descrito leucopenia, leucocitose, neutrofilia, neutropenia, linfocitose, eosinofilia e monocitose (25, 59). No leucograma de animais com *R. vitalii*, frequentemente há leucocitose, com desvio a esquerda regenerativo, e em alguns casos, reação leucemóide, linfocitose e monocitose (2).

Anemia e trombocitopenia são as alterações sanguíneas mais encontradas em cães com infecção natural ou experimental por *E. canis* (60). A trombocitopenia aparece como resultado da hipoplasia megacariocítica e da redução da vida das plaquetas, que ocorrem secundariamente a alterações imunomediadas (decréscimo da adesividade), inflamatórias e por perturbação nos mecanismos de coagulação (CID). Na fase aguda da ehrlichiose monocítica canina, anemia arregenerativa associada à leucopenia são comuns (10). Pancitopenia, monocitose, linfocitose são achados frequentes na fase crônica da doença (61). A persistência de *E. canis* no interior da célula hospedeira conduz a uma reação de hipersensibilidade ou a uma resposta imunomediada, acarretando na diminuição dos elementos sanguíneos (10).

#### **2.4.2 Parasitológico**

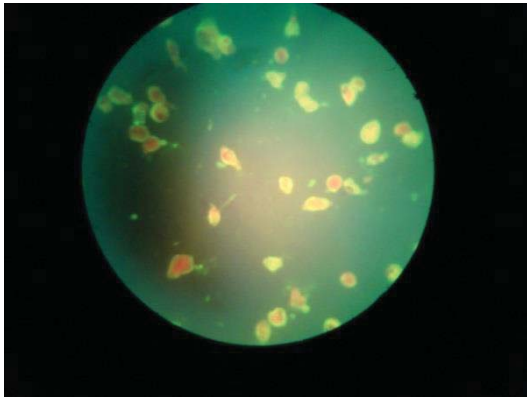
O exame microscópico direto em esfregaço sanguíneo é um método convencionalmente empregado no diagnóstico de hemoparasitoses, tendo como base as características morfométricas de referência para cada espécie de parasita (62). O exame parasitológico deve ser realizado a partir de sangue venoso periférico, principalmente de pequenos capilares da orelha, pois, o microorganismo causa peroxidação lipídica da membrana da hemácia e conseqüente acúmulo em vasos de menor calibre (10, 46). A coloração das lâminas com sangue periférico pode ser do tipo Giemsa, Romanowsky, Wright, Rosenfeld ou Diff-Quick (63). O diagnóstico pode ser dado através da visualização do parasita (*B. canis* e *R. vitalii*) ou de sua forma característica (mórulas de *E. canis*), no interior de células sanguíneas (eritrócitos e leucócitos) ou livre no plasma (1, 2, 10). É um exame útil na fase aguda da doença, que coincide com o pico da parasitemia (64). A detecção direta por meio do exame parasitológico em esfregaço sanguíneo é uma técnica rápida, porém de baixa sensibilidade. O baixo número de células parasitadas, a experiência do microscopista e número reduzido de esfregaços sanguíneos afetam a sensibilidade do teste (9, 16).



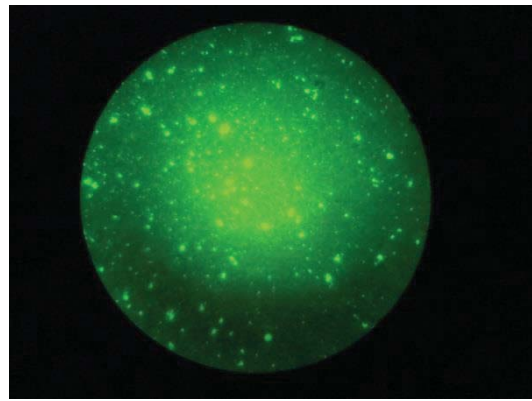
**Figura 1.** Protozoários do gênero *R. vitalii* livres no plasma sanguíneo e no citoplasma de célula mononuclear em um cão.

#### 2.4.3 Testes sorológicos

Na fase subclínica ou crônica das hemoparasitoses, métodos de diagnóstico indiretos como as provas sorológicas são utilizados na pesquisa de anticorpos específicos contra os agentes. Métodos sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta - RIFI, o ensaio imunoenzimático – ELISA, entre outros, são os mais comumente realizados na prática clínica (64). Embora os testes sorológicos sejam frequentemente utilizados como método de diagnóstico, sabe-se que as várias espécies de hemoparasitas dividem antígenos em comum, gerando reações cruzadas. A sorologia pode apresentar resultados negativos durante a primeira semana de infecção (9, 65) e não distingue uma infecção atual de uma infecção prévia (66). Desse modo, a interpretação de exames sorológicos deve ser cautelosa e realizada em conjunto com outros parâmetros como sinais clínicos e exame físico do animal acometido; ainda, através de dados laboratoriais relevantes, como a contagem plaquetária (46). Atualmente ainda não existem testes comerciais disponíveis no Brasil que permitam a determinação de anticorpos séricos contra *R. vitalii* (2).



**Figura 2.** Exame sorológico (RIFI) positivo para *E. canis*.

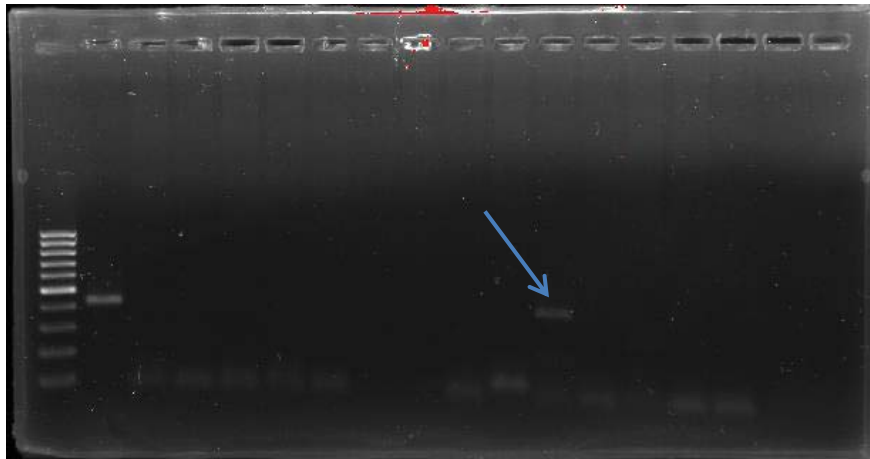


**Figura 3.** Exame sorológico (RIFI) positivo para *B. canis*.

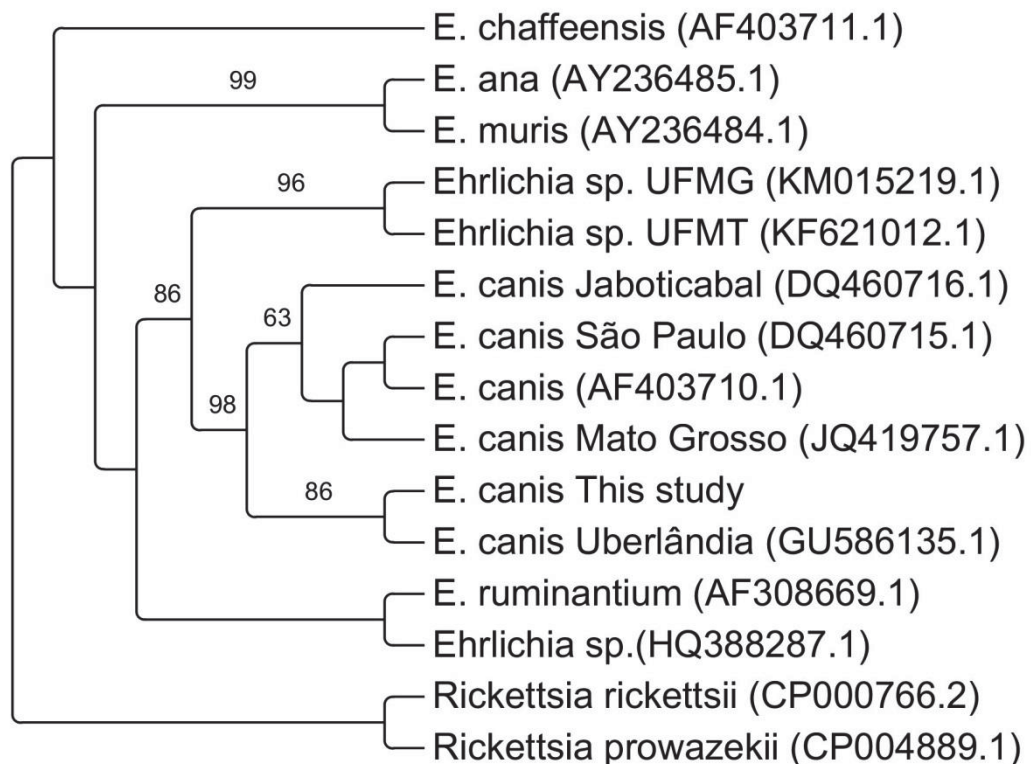
#### 2.4.4 Diagnóstico molecular

A realização de uma PCR, amplificando o DNA das espécies de hemoparasitas, seguida por sequenciamento, é uma ferramenta útil para o estudo epidemiológico de uma infecção em carrapatos e vertebrados (67). Os fragmentos amplificados pela PCR devem ser sequenciados para confirmar a validade dos resultados e diferenciar as espécies envolvidas (68).

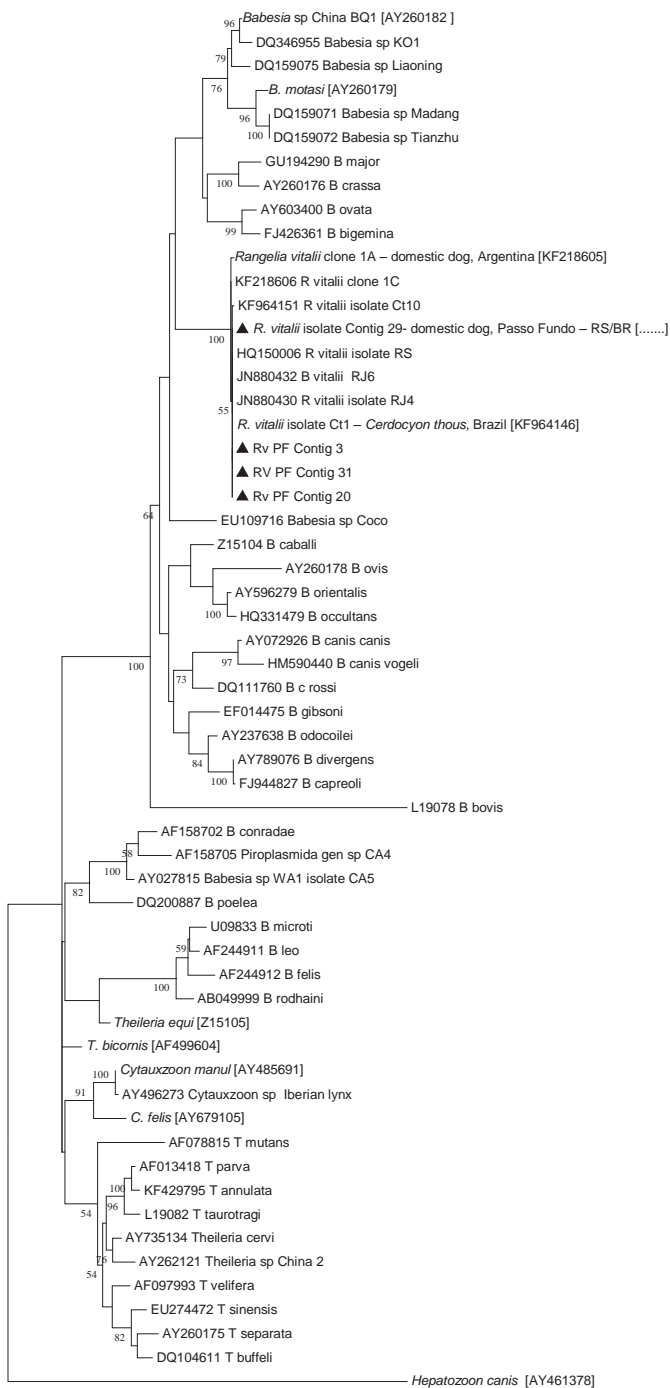
A sorologia e o exame microscópico em esfregaço sanguíneo muitas vezes resultam em diagnósticos falso-negativos além de não permitirem a diferenciação entre as subespécies (27). Entretanto, a PCR e o sequenciamento das amostras positivas têm se mostrado altamente sensíveis e específicos, determinando o agente e a subespécie envolvida, sendo importante no estabelecimento de um método diagnóstico definitivo (4).



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose mostrando os resultados da PCR para a detecção do gene Dsb de *Ehrlichia canis*. Coluna 1: marcador de pares de base (pb) 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); Coluna 2: controle positivo; Coluna 12: cão positivo para *E. canis* (seta); Coluna 17: controle negativo.



**Figura 5.** Árvore filogenética baseada em sequências de *Ehrlichia* spp. dirigida para o gene *dsb*. A árvore foi obtida por meio do método de *Maximum-likelihood* utilizando a facilitate CIPRES ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). Os valores de bootstrap menores que 60 não são mostrados. *R. prowazekii* e *R. rickettsii* foram utilizadas como (*outgroup*).



**Figura 6.** Árvore filogenética baseada em sequências de *Rangelia vitalii* dirigida para o gene 18S de rRNA. A árvore foi obtida por meio do método de *Maximum-likelihood* de acordo com a menor pontuação do parâmetro BIC (Bayesian Information Criterio). *Hepatozoon canis* foi utilizada como (*outgroup*).

### 3 CHAPTER 1

#### Molecular characterization of *E. canis* and *R. vitalii* in southern Brazil

Juliana Gottlieb<sup>1\*</sup>, Rosangela Zacarias Machado<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Bortolini<sup>3</sup>, Marcos Rogério André<sup>2</sup>, João Fábio Soares<sup>7</sup>, Luiz Ricardo Gonçalves<sup>5</sup>, Veridiane da Rosa Gomes<sup>6</sup>, Mariana Dalla Palma<sup>6</sup>, Mateus Tonial de Oliveira<sup>1</sup>, Marcio Machado Costa<sup>3</sup>, Marcelo Labruna<sup>7</sup>, Maria Isabel Botelho Vieira<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Master's student enrolled in the Postgraduate Program of Bio-experimentation, University of Passo Fundo-UPF, Passo Fundo, RS, Brazil

\*Corresponding author: J. Gottlieb, Professor of the Course in Veterinary Medicine, Ideau Faculty. Campus II, Bairro Centro. 99900-000 Getúlio Vargas, RS, Brazil. Phone: +55 54 33416600. E-mail: jugottlieb@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Professor of the Postgraduate Program of Parasitology, UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil

<sup>3</sup> Professor of the Course in Veterinary Medicine, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>4</sup> PhD awarded by the Postgraduate Program of Experimental Epidemiology Applied Zoonoses. Dept. of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health at FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup> Master's student enrolled in the Postgraduate Program of Parasitology, UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil

<sup>6</sup> Student enrolled in the Residency Program in Small Animal Internal Medicine, UPF, RS, Brazil

<sup>7</sup> Professor of the Postgraduate Program of Experimental Epidemiology Applied Zoonoses. Dept. of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health at FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brazil

<sup>8</sup> Professor of the Postgraduate Program of Bio-experimentation, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil

Article submitted to the journal Veterinary Parasitology on: 20 Aug 2014.

#### Abstract

The purpose of this study was to diagnose the causative agents of infection in dogs with suspected hemoparasites treated during the clinical routine of the Veterinary Hospital at the University of Passo Fundo, in the municipality of Passo Fundo, RS, Brazil. Samples of venous blood were drawn from dogs displaying symptoms such as depression, anorexia and fever, and were analyzed by conventional PCR for *Babesia* spp. (18S rRNA gene), *Rangelia vitalii* (18S rRNA gene) and *Ehrlichia* spp. (dsb genes). Among the 58 sampled dogs, four (6.8%) tested positive for *R. vitalii* and one (1.7%) for *E. canis*. The PCR products were sequenced and the *E. canis* and *R. vitalii* DNA found showed genetic similarity to samples of *E. canis* and *R. vitalii* isolated in Brazil, with 99% similarity when compared to sequences previously deposited in GenBank. We emphasize the importance of the first molecular detection of *E. canis* in dogs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

**Keywords:** *Ehrlichia* spp., *Rangelia vitalii*, PCR, sequencing, phylogeny



## 1. INTRODUCTION

Arthropod vectors of disease are important to worldwide human and animal health (Harrus and Baneth, 2006). In this context, *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., and *Rangelia vitalii* are microorganisms transferred by ticks to dogs during the hematophagous process (Solano-Gallego et al., 2006; Figuera, 2007). *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* are transmitted to vertebrate hosts by the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Taboada and Merchant, 1997; Dumler et al., 2001). According to Soares (2012), the tick *Amblyomma aureolatum* was able to transmit *R. vitalii* to dogs, but the arthropod *R. sanguineus* was not able to transmit the same pathogen in these animals. *R. vitalii* has been reported in South America in domestic dogs in south and southeastern Brazil (Moreira et al., 2013; Soares et al., 2013), in Argentina (Eiras et al., 2012), and in Uruguay (Sarasua and Donati, 1976).

The species that have been detected by molecular diagnosis in Brazil are *Babesia vogeli* (Furuta, 2004; Passos et al., 2005) and *Babesia gibsoni* (Trapp et al., 2006). *E. canis* was first described in Brazil in the city of Belo Horizonte by Costa et al. (1973), but there were no data proving the presence of *E. canis* by molecular diagnosis in the south of the country. A serological study involving 316 dogs conducted in the central region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, showed that 4.43% animals presented antibodies against *E. canis* by the indirect fluorescence antibody test (IFAT), although infestation by the tick *R. sanguineus* is common in this region. Seropositivity to the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis is higher than 30% in Brazil's other regions (Krawczak et al., 2012).

PCR amplification of the DNA of hemoparasite species, followed by sequencing, is a useful tool for the epidemiological study of infection in ticks and vertebrates (Inokuma et al., 2001). The fragments amplified PCR by should be sequenced to confirm the validity of the results and to differentiate the species involved (Massung and Slater, 2003). PCR and sequencing of positive samples has proved to be highly sensitive and specific, and is important in establishing a definitive diagnostic method, since the clinical signs involved in hemoparasite infections are clinically very similar (Criado-Fornelio et al., 2003).

This study focused on the diagnosis of infection by *B. canis*, *E. canis* and *R. vitalii* in dogs with symptoms compatible with tick-borne diseases in southern Brazil, using molecular methods.



## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Experimental animals

Blood samples for molecular diagnosis were collected from the jugular vein of dogs presenting clinical signs of hemoparasites (apathy, anorexia and fever) at the Veterinary Hospital of the University of Passo Fundo, from January through December 2013.

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Passo Fundo (CEUA-UPF), under permit no. 003/2013.

### 2.2 Molecular analysis

The blood samples were subjected to DNA extraction using a commercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Hilden, Germany), as recommended by the manufacturer. The DNA was subjected to a nested PCR assay for *Babesia* spp., as proposed by Jefferies et al. (2007), in which the oligonucleotide primers BTF1 (5-GGCTCATTACAACAGTTATAG-3), BTR1 (5-CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3), BTF2 (5-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3), and BTR2 (GGACTACGACGGTATCTGATCG-3) flank a fragment of 800 base pairs of the 18S Rna gene. The oligonucleotide primers Dsb-330 (5-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3) and Dsb-728 (5-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3), which flank a fragment of 409 base pairs of the Dsb gene (Doyle et al., 2005), were used to amplify the DNA of the genus *Ehrlichia* spp. The molecular analysis of the microorganisms *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. was performed in the Laboratory of Immunoparasitology at UNESP Jaboticabal, SP, Brazil.

For the research into *R. vitalii*, the samples were subjected to PCR using the pair of primers BAB143-167 (5-CCG TGC TAA TTG TAG GGCTAA TAC A-3) and BAB694-667 (5-GCT TGA AAC ACT CTARTT TTC TCA AAG-3), which amplify a fragment of  $\pm$  500-bp of the 18S rRNA gene of *Babesia* spp. The molecular analysis of *R. vitalii* was performed as described by Soares et al. (2011), at the Laboratory of Parasitic Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny –

FMVZ/USP/SP.

The PCR products were then subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and examined under an UV transilluminator (ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Imaging System, BIO RAD<sup>®</sup>). The same concentrations of reagents and cycling as those described by Doyle et al. (2005), Jefferies et al. (2007) and Soares et al. (2011) were used for the PCR analysis.

### 2.3 Phylogenetic analysis

The amplicons were purified using commercial Silica Bead DNA Gel Extraction Kits (Fermentas<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) and sequenced in an automated sequencer (Applied Biosystems ABI PRISM 3700 DNA Analyzer), following the instructions of the technical manual. The sequences thus obtained were analyzed using BLAST (Altschul et al., 1990) to determine genetic similarities with the data deposited in GenBank.

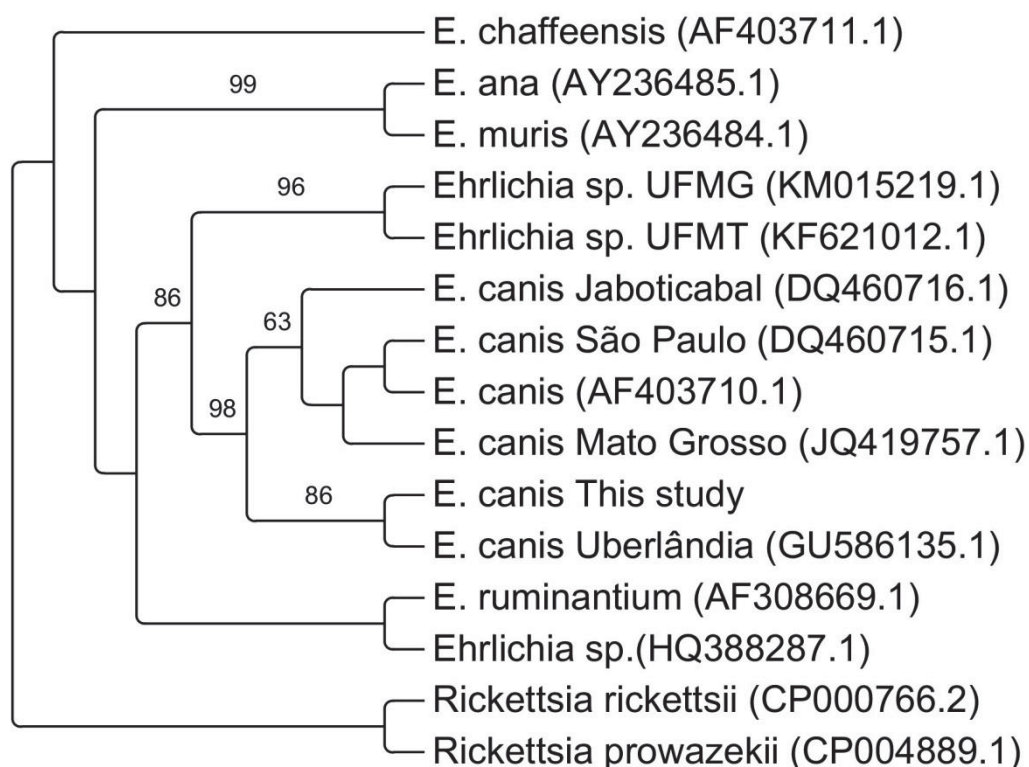
For the phylogenetic analysis of the *dsb* gene of *Ehrlichia* spp., the sequence obtained in this study, together with the sequences taken from GenBank, were aligned using the ClustalW alignment program in BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). The phylogenetic tree obtained by means of the Maximum Likelihood optimization criterion using the JTT substitution model was generated using the CIPRES facility ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)).

Partial sequences of the 18S rRNA gene derived from the four positive samples were aligned with genotypes of the genera *Babesia*, *Rangelia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* and *Hepatozoon*, taken from GenBank, using the ClustalW v. 1.8.1 program (Thompson et al., 1994). Using the nucleotide substitution model, a Maximum Likelihood phylogenetic tree was generated by the Mega 6.0.6 software program (Tamura et al., 2013) with 100 bootstrap replicates. The substitution model was selected using Mega 6.0.6 software (Tamura et al., 2013), based on the lowest score of the BIC (Bayesian Information Criterion) parameter. The sequence of *Hepatozoon canis* was used as outgroup.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

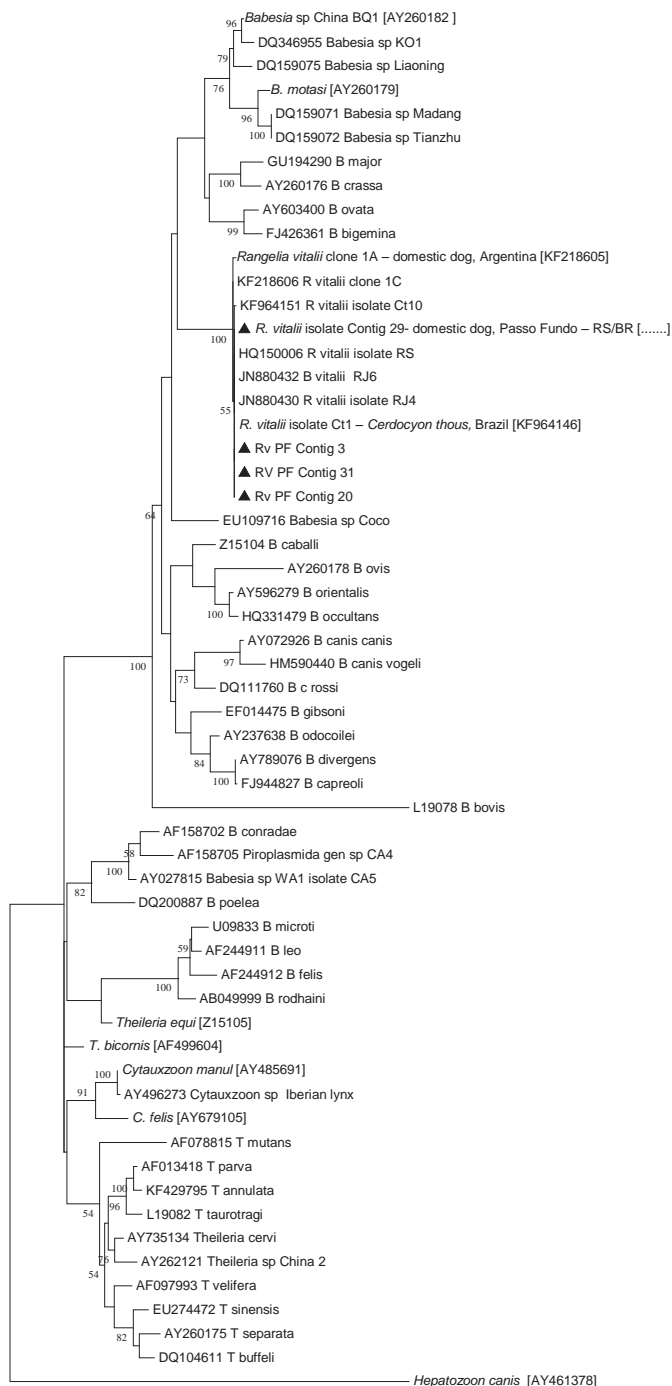
Of the 58 sampled dogs, four (6.8%) were positive for *R. vitalii* and one (1.7%) for *E. canis* by PCR. The PCR products were sequenced and the *E. canis* (Figure 1) and *R. vitalii* DNA found showed genetic similarity with samples of *E. canis* and *R. vitalii* isolated in Brazil, with 99% similarity when compared to the data deposited in GenBank, using the BLAST program. The analysis of the sequence obtained in this study showed 99% similarity with the *E. canis* Uberlandia strain ([GU586135.1](#)) and 100% by BLASTp with the disulfide oxidoreductase gene of *E. canis* ([ADD73441.1](#)).

Despite the low frequency of animals positive for *E. canis* in the PCR, we highlight the significance of this first molecular detection of the agent in dogs in the northern region of the state of Rio Grande do Sul.



**Figure 1.** Phylogenetic tree based on *Ehrlichia* spp. sequences directed to the *dsb* gene. The tree was created by means of the Maximum likelihood method using the CIPRES facility ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). Bootstrap values below 60 are not shown. *R. prowazekii* and *R. rickettsii* were used as outgroups.

Initially, four (6.8%) dogs tested positive for *B. canis* in the molecular diagnosis, but after sequencing of these samples, the presence of *R. vitalii* was detected (Figure 2). The presence of the agent *Babesia* spp. was not detected in our study. The blood of the four animals (6.8%) positive for *R. vitalii* was subjected to PCR and sequencing using two different protocols: Jefferies et al. (2007) and Soares et al. (2011). The results highlight the importance of sequencing to determine the definitive diagnosis. The protocol proposed by Jefferies et al. (2007) amplifies the 18S rRNA gene segment, which is common to the species *R. vitalii* and *Babesia* spp, demonstrating that these species are phylogenetically related.



**Figure 2.** Phylogenetic tree based on sequences of *Rangelia vitalii* directed to the 18S rRNA gene. The tree was obtained by the Maximum Likelihood method, based on the lowest score of the parameter BIC (Bayesian Information Criterion). *Hepatozoon canis* was used as outgroup.

The agent found most frequently in the evaluated animals was *R. vitalii*. Although canine rangelioidosis has been overlooked for five decades and erroneously described as a synonym for *B. canis* (Moreira, 1939), the species was recently reviewed (Soares et al., 2011) and the results of the research indicate that this is a re-emerging disease.

The dog that tested positive for *E. canis* in the PCR lived in an urban area of the city where the study was conducted. The owner claimed he had not changed his address

or travelled recently, and that the dog had not been in contact with animals from other regions. Ticks of the species *R. sanguineus* are widely distributed throughout the world and are known vectors of pathogens such as *B. vogeli*, *E. canis* and *Rickettsia conorii* (Dantas-Torres, 2008). However, the presence of *B. vogeli* and *E. canis* co-infection was not observed in the molecular diagnosis in the region of this study.

The dog that tested positive for *E. canis* in the molecular diagnosis had no ectoparasites upon clinical examination. Of the four dogs (6.8%) positive for *R. vitalii* in the PCR, two dogs (50%) showed ectoparasites and the other two (50%) presented no ectoparasites when clinically examined. A taxonomic study identified *R. sanguineus*, *A. aureolatum* and *Amblyomma ovale* as the ticks most frequently found on canines in the northern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil (Gauger et al., 2013).

In view of the unquestionable veterinary importance of the *R. sanguineus* complex, Labruna et al. (2011) contributed significantly to the identification of at least two distinct groups of ticks under the taxon *R. sanguineus* in Latin America; one resembling the ticks of African origin and distributed in tropical and subtropical America (*R. sanguineus*) and the other resembling the European specimens and distributed in temperate South America (*R. turanicus*). Based on this information, one could ponder about the role of these ticks in the transmission of *E. canis*; thus, more studies are needed to identify their vectorial capacity.

The only clinical sign presented by the dog positive for *E. canis* in the molecular diagnosis was apathy. The hematological analysis of this animal was within the normal range for the species, and the parasitological examination of its blood smear and serology for *E. canis* tested negative. This suggests that this dog presented the subclinical phase of canine monocytic ehrlichiosis. According to Harrus et al. (1998b), thrombocytopenia is not a common finding, and is usually subtle when detected at this stage, confirming the findings of this study.

Of the four dogs (6.8%) positive for *R. vitalii* in the molecular diagnosis, two animals (50%) lived in the urban area and the other two (50%) in the countryside. One of the owners reported that, although he lived in an urban area, the dog spent time in the countryside of Rio Grande do Sul during certain times of the year. The findings of this survey may indicate that urban dogs have greater contact with rural settings and wild animals, as a result of processes such as deforestation and the expansion of urban centers, and therefore, greater exposure to the arthropod *A. aureolatum*. It is speculated that in rural areas of Brazil, wildlife could play an important role as a reservoir of *R.*

*vitalii* (Loreti and Barros, 2005). The parasite has been detected by molecular diagnosis in the blood and tissues of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in the northern region of Rio Grande do Sul and in the central and northern regions of the state of São Paulo (Soares et al., 2014). This suggests that this wild animal may be involved in the lifecycle of *R. vitalii* in the study region (Loreti and Barros, 2005; Soares et al., 2014). This information supports the hypothesis that *R. vitalli* circulates between vertebrate animals and the tick *A. aureolatum*.

Apathy, hyporexia, emaciation and mucopurulent ocular and nasal discharge were clinical signs presented by dogs positive for *R. vitalii* by PCR. The hematological analysis revealed thrombocytopenia in the four animals positive for the agent. Mild to moderate thrombocytopenia is commonly observed in dogs suffering from rangelirosis, and some of the mechanisms involved are splenic sequestration, platelet dysfunction, immune-mediated thrombocytopenia, consumptive thrombocytopenia, and decreased platelet aggregation (Figuera et al., 2010; Paim et al., 2012a). Serological tests for *R. vitalii* were not performed because, to date, there is no commercial kit available in Brazil.

The agents found in molecular diagnosis help to guide clinical management strategies and control measures, and to define the diagnosis. We suggest more research on this topic should be conducted, particularly pertaining to the epidemiology of hemoparasitic diseases, given that the data reported here refer to a portion of the resident dog population which, in theory, receives care and attention from its owners. The results of such evaluations might be different if they involved strays and animals from shelters and/or animal welfare NGOs.

#### 4. CONCLUSIONS

The agents identified by molecular diagnosis in the study area were *R. vitalii* and *E. canis*. These pathogens cause diseases that often exhibit non-specific signs; therefore, molecular diagnostics is a very important tool for conducting specific treatments that help reduce the adverse effects of some medications, as well as the possible resistance associated with their unnecessary use.



## References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basiclocal alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Costa, J.O., Silva, M., Batista Jr., J.A., 1973. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte-Brazil. *Arch. Bras. Med. Vet. Zootec.*, UFMG, 25, 199-200.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-Del-Rio, M.A., Bulling-Sarana, A., Barba-Carretero, J. C., 2003. Molecular characterization of *Babesia gibsoni* isolate from Spanish dog. *Vet. Parasitol.* 117, 123-129.
- Dantas-Torres, F., 2008. Causative agents of canine babesiosis in Brazil. *Prev. Vet. Med.*, 83, 210-211.
- Doyle, C.K., Labruna, M.B., Breitschwerdt, E.B., Tang, Y., Corstvet, R.E., Hegarty, B. C., Bloch, K.C., Li, Ping., 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.* 07, 504-510.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., et al., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(6): 2145-2165.
- Figuera, R.A., 2007. Rangeliose. *Acta Sci. Vet.* 35, 261-263.
- Eiras, D.F., Craviotto, M.B., Baneth, G., MORÉ, G., 2012. First description of *Rangelia Vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) in the canine species in Argentina. XIX Meeting

- Scientific Technical Association of Veterinaries Argentina Diagnostic Laboratories. Proceedings.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.D., 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.
- Furuta, P.I., 2004. Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of IgG antibodies in dogs naturally infected with *Babesia canis*. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.
- 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.
- Harrus, S., Baneth, G., 2006. Drivers for the emergence and re-emergence of vectorborne protozoal and bacterial diseases. *Int. J. Parasitol.* 1309-1318.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M., Bark, H., 1998b. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 73-76.
- Inokuma, H., Raoult, D., Brouqui, P., 2001. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4219-4221.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2007. PCR-RFLP for the detection and differentiation species and its use with filter paper-based technologies. *Vet. Parasitol.* 144, 20-27.

- Gauger, A.L, Vivan, C.C, Vieira, M.I.B, Andrade, C.G, Luz, H.R., Landulfo, G.A., Faccini, J.L.H., Barros-Batestti, D.M. 2013. Ticks in dogs treated at the hospital of the University of Passo Fundo-RS, Brazil. IV Simpósio Brasileiro de Acarologia, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil. Protocolo 40, apresentado em formato de pôster no período de 30 de abril-03 de maio.
- Krawczak, 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 of Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21, 415-417.
- Moraes, J.F., Marcili, A., Nieri-Bastosa, F.A., Richtzenhain, L.J., Labruna, M.B., 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.*, 117, 51–55.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193-213.
- Massung, R.F., Slater, K., 2003. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol.* 2, 717-722.
- Moreira, M.V.L., Guimarães, L.B., Silva, J.F., Ocarino, N.M., Serakides, R., Ecco, R., 2013. Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. *Arch. Vet. Sci.* 18, 637-639.
- Paim, C.B., Paim, F.C., Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Leal, C.A., Soares, J.F., Labruna, M.B., Schetinger, M.R., Mazzanti, A., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T., 2012a. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Parasitol.* 185, 131-137.

- Passos, L.M.F., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F.B., Pfister, K., Zahlerrinder, M., 2005. First molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 127, 81-85.
- Sarasúa, L.M., Donati, N.R., 1976. Establishment of canine babesiosis in the Department of Artigas (Uruguay). *Vet. Urug.*, 12, 137-139.
- Soares, J.F., Dall'Agnol, B., Costa, F.B., Krawczak, F.S., Comerlato, A.T., Rossato, et al., 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., Dalmolin, M.L., França, R.T., Hlavac, N.R.C., Moroz, L.R., Alves, C.B.R., Salomão, E.L., Pelissar, M.H.S., Franchini, M.L., Miyashiro, S., Lopes, S.T.A., Lacerda, L.A., Hagiwara, M.K., Labruna., 2013. Detecção molecular de *Rangelia vitalii* nos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. IV SIBAC. Bento Gonçalves-RS, Brazil. Proceedings.
- Soares, J.F., Costa, F.B., Soares, H.S., Da Silva, A.S., França, R.T., Miyashiro, S., et al., 2012. Caracterização morfológica, molecular, e estudos dos ixodídeos vetores de *Rangelia vitalii*. XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, São Luis, MA, Brazil. Proceedings.
- Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., Da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of acanine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180, 203–208.
- Solano-Gallego, L., 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet. Res.* 37, 231-244.
- Taboada, J., Merchant, S. R. Protozoal infections and other causes. In: Ettinger, S. J., Feldman, E. C. *Treaty of Veterinary Internal Medicine*, 4.Ed., São Paulo: Manole, p. 554-572, 1997.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- 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. *Nucleic Acids Res.* 11, 22(22), 4673-80.
- Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., Morais, H.S., 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.* 140, 223-230.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os agentes encontrados no diagnóstico molecular ajudam no direcionamento de condutas clínicas, nas medidas de controle e na definição do diagnóstico. Estas hemoparasitoses muitas vezes apresentam sinais inespecíficos, portanto o diagnóstico molecular é uma ferramenta muito importante para a condução de um tratamento específico que, corrobora na redução dos efeitos adversos de algumas medicações bem como na possível resistência associada ao uso desnecessário.

Sugerem-se mais pesquisas relacionadas ao tema, principalmente no que se refere à epidemiologia das hemoparasitoses, pois os dados obtidos referem-se a uma parcela da população canina domiciliada e que teoricamente recebem cuidados e atenção de seus responsáveis. Possivelmente, os resultados serão diferentes se animais errantes e provenientes de abrigos e/ou ONGs de proteção forem avaliados.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Taboada J, Merchant SR. Infecções por protozoários e por outras causas. In: Ettinger SJ., Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4. ed. São Paulo: Manole; 1997. p. 554-72.
2. Fighera RA. Rangeliose. Acta Sci. Vet. 2007; 35:261-3.
3. Gasparni MR, Coelho ALM, Jojima FS, Vidotto MC, Vidotto O. Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. In: Programa e Resumos do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul, Curitiba. XV Congr. Bras. Parasitol. Vet. Curitiba-PR-Brasil. 2008; 15.
4. Criado-Fornelio A, Gonzalez-Del-Rio MA, Bulling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Molecular characterization of *Babesia gibsoni* isolate from Spanish dog. Vet. Parasitol. 2003; 117:123-9.
5. Ungar De Sá MFM, Úngar De Sá JE, Bittencourt DVV, Bispo AC, Régis AMM, Souza Filho NJ, et al. Estudo retrospectivo (1991-2005) dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e região Metropolitana, Bahia. RBSPA. 2007; 8(3):178-183.
6. Kocan AA, Kjemtrup A, MeinKoth J, Whitworth LC, Murphy GL, Decker L, et al. A genotypically unique *Babesia gibsoni*-like parasite recovered from a dog in Oklahoma. J. Parasitol. 2001; 87:437-38.
7. Harrus S, Baneth G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector borne protozoal and bacterial diseases. Int. J. Parasitol. 2006; 11/12:1309-18.
8. Solano-Galego, LA. Serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. Vet. Res. 2006; 37(2), .231-244.
9. Paddock CD, Childs JE. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16(1):37-64.
10. Almosny NRP. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: Almosny NRP. (Eds.). Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: L.F. Livros; 2002, 58-67.
11. O'Dwyer LHO, Massard CL. Babesiose em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. In: Almosny NRP. (Org.). Hemoparasitoses em Pequenos

- Animais Domésticos e como Zoonoses. Rio de Janeiro:L. F. Livros de Veterinária; 2002, 57-67.
12. Vial HJ, Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis. *Vet. Parasitol.* 2006; 138:147–60.
  13. Citard T, Mahl P, Boulouis HJ, Chavigny C, Druilhe P. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Trop. Med. Parasitol.* 1995; 46(3):172-9.
  14. Schettters TP, Kleuskens JA, Scholtes NC, Pasman JW, Goovaerts D. Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. *Vet. Parasitol.* 1997; 73(1/2):35-41.
  15. Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2003; 33(4):885-904.
  16. Passos LMF, Geiger SM, Ribeiro MFB, Pfister K, Zahlerrinder M. First molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 2005; 127:81-5.
  17. Loreti AP, Barros SS. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2005; 134(3/4):193-213.
  18. Uilenberg G, Franssen FFJ, Perié NM. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Quart.* 1989; 1:33-40.
  19. Oyamada M, Davoust B, Boni M, Dereure J, Bucheton B, Hammad A, et al. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of Eastern Sundan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *CI. Diag. Lab. Immunol.* 2005; 12:1343-46.
  20. Caccio SM, Antunovic B, Moretti A, Mangili V, Marinculic A, Baric RR, et al. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 2002; 106:285-92.
  21. Matjila PT, Penzhorn BL, Bekker CPJ, Nijhof AM, Jongejan F. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 2004; 122:119-25.



22. Jefferies R, Ryan UM, Muhinickel CJ, Irwin PJ. Two Species of Canine Babesia in Australia: Detection and characterization by PCR. *J. Parasitol.* 2003; 89:409-12.
23. Gülanber A, Gorenflot A, Schetters TPM, Carcy B. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet. Parasitol.* 2006; 139:224-30.
24. Braccini GL, Chaplin EL, Stobbe NS, Araujo FAP, Santos NR. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 1986-1990. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.* 1992; 20:134-49.
25. Guimarães JC, Albernaz AP, Machado JA, Júnior OAM, Garcia LNN. Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2004; 13:229.
26. Dantas-Torres F. Causative agents of canine babesiosis in Brazil. *Prev. Vet. Med.* 2008; 83:210-1.
27. Duarte SC, Linhares GFC, Romanowski TN, Neto OJS, Borges LMF. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet. Parasitol.* 2008; 152:16-20.
28. Vasconcelos MF. Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2010.
29. Trapp SM, Dagnone AS, Vidotto O, Freire RL, Amude AM, Morais HS. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.* 2006; 140:223-30.
30. Furuta PI. Avaliação comparativa entre o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis* [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
31. Donatien A, Lestoquard F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1935; 28:426-31.
32. Costa JO, Silva M, Batista Júnior JA. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte-Brasil. *Arq. Bras. Zoo. Med. Vet. UFMG.* 1973; 25:199-200.

33. Labarthe N, Campos D, Pereira M, Balbarin IO, McKee W, Coimbra CA, Hoskins J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet. Ther J. Trenton*. 2003; 4:67-75.
34. Moreira SM. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec*. 2003; 55:141-7.
35. Rezende HEB. Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910) hemoparasito de cães no Estado do Rio de Janeiro. In: XV Congr. Bras. de Med. Vet., Rio de Janeiro-RJ-Brasil; 1976. p. 159-60.
36. Krauspenhar C, Figuera RA, Graça, DL. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. *MEDVEP*. 2003; 1(4):273-81.
37. França RT, Silva AS, Paim FC. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comp. Clin. Pathol*. 2010; 19:383-87.
38. Lemos TD, Cerqueira AM, Tomas, HK, Silva AV, Corrêa RG, Paludo GR, et al. Detection and molecular characterization of piroplasm species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol*. 2012; 21:137-42.
39. Moreira MVL, Guimarães LB, Silva JF, Ocarino NM, Serakides R, Ecco R. Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. *Arch. Vet. Sci*. 2013; 18:637-9.
40. Soares JF, Girotto A, Dalmolin ML, França RT, Hlavac NRC, Moroz LR, et al. Detecção molecular de *Rangelia vitalii* nos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: IV SIBAC, Bento Gonçalves-RS. Proceedings.
41. Soares JF, Dall'Agnol B, Costa FB, Krawczak FS, Comerlato AT, Rossato BCD, et al. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.058>
42. Eiras DF, Craviotto MB, Baneth G, Moré G. Primer descripción de *Rangelia vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) en la especie canina en Argentina. XIX Reun. Cient. Tec. Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag. Proceedings. 2012; 338-9.
43. Sarasúa LM, Donati NR. Constatación de babesiosis canina en el Departamento de Artigas (Uruguay). *Vet. Urug*. 1976; 12:137-9.

44. Levine ND. Veterinary Protozoology. EUA: Ames, Iowa State University Press; 1985. p.81-90.
45. Lobetti RG. Canine babesiosis. The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 1998; 20(4):418-31.
46. Taboada J. Babesiosis. In: Greene CE. (Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p. 473-81.
47. Pedersen NC. A review of immunologic diseases of the dog. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 69:251-342.
48. Irwin PJ. Babesiosis and cytauxzoonosis. In Shaw SE, Day MJ. (Eds), Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. EUA:Manson Publishin; 2005. p. 63-77.
49. Lappin MR. Infecções protozoárias e mistas. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 430-40.
50. Vidotto O, Trapp SM. Babesiose canina. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2004; 13:58.
51. Quinn PJ. Bacterial Diseases. Microbial and parasitic diseases of the dog and cat. London: Saunders; 1997. p. 229-33.
52. Nyindo MBA, Ristic M, Huxsoll DL, Smith AR. Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent – *Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. 1971; 32(1):1651-58.
53. Breitschwerdt EB. As Riquetsioses. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 422-29.
54. Susan EL. Doenças Transmitidas por Vetores. In: Bowman DD. Georgis Parasitologia Veterinária. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 229-41.
55. França RT, Silva AS, Paim FC. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. Comp. Clin. Pathol. 2010; 19:383-87.

56. Figuera RA, Souza TM, Kommers GG. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológico da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesq. Vet. Bras.* 2010; 30:974-87.
57. Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 2005; 134:77-85.
58. Campos KCH, Machado LP, Santos KR, Takahira R.K, Lopes RS, Silveira VF, et al. Incidência de trombocitopenia em cães naturalmente infectados por *Babesia canis*. In: 6ª Mostra científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Botucatu-SP-Brasil, Anais; 2002, 56.
59. Vercammen FDE, Deken R, Maes L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. *Vet. Parasitol.* 1997; 68:51-5.
60. M'Ghirbi Y. Clinical, serological and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Parasitol. Res.* 2009; 104(4):767-74.
61. Ewing SA, Bucker RG, Springer BC. The coyote, a potential host for *Babesia canis* and *Ehrlichia* sp. *J. Parasitol.* 1964; 50:704.
62. Kjemtrup AM, Wainwright K, Miller M, Penzhorn BL, Carreno RA. *Babesia conradae*, sp. Nov., small canine Babesia identified in California: *Babesia conradae* on the literature. *Vet. Parasitol.* 2006, 138:103-11.
63. Bounous DI, Hoskins JD, Boudreaux MK. O Sistema Hematopoético. In: Hoskins JD. *Pediatria Veterinária*. São Paulo: Manole; 1993. p. 317-51.
64. Neves DP. *Parasitologia Humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu; 2000, 428.
65. Walker DH, Dumler JS. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. *Emerg. Infect. Diseases.* 1996; 2:201-300.
66. Shaw SE, Birtles RJ, Day MJ. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *J. Feline Med. Surg.* 2001; 3(4):193-209.

67. Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. J. Clin. Microbiol. 2001; 38(11):4219-21.
  
68. Massung RF, Slater K. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(2):717-22.

## ANEXO I

Ficha de anamnese e exame clínico de animais com suspeita clínica primária de *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e/ou *Rangelia vitalii*

Data da consulta;

Estação do ano;

Nome e número da ficha do paciente;

Sexo;

Raça;

Peso (Kg);

Pelagem;

Idade;

Contactantes;

Controle reprodutivo;

História médica pregressa;

Tipo de alimentação, frequência;

Vermífugos e vacinas;

Exposição a pulgas e carrapatos e se o proprietário faz controle de ectoparasitas, como?

Ambiente que o animal vive (urbano, rural, casa ou apartamento) tem contato com grama?

Comportamento do paciente (excitado, normal, deprimido, comatoso);

### **Queixa principal?**

Se o paciente apresentar três ou mais sinais clínicos compatíveis com os citados abaixo, esta ficha deve ser preenchida: depressão, anorexia, linfadenopatia, perda de peso, presença de pulgas e/ou carrapatos e febre;

Sinais clínicos gerais: (febre, linfadenopatia, distúrbios de coagulação, etc...);

Sinais clínicos do sistema gastrointestinal: (vômito, diarreia, apetite, etc...);

Sinais clínicos do sistema respiratório: (tosse, taquipnéia, broncopneumonia, secreção nasal e/ou ocular, etc...);

Sinais clínicos do sistema urinário: (hematúria, poliúria, etc...);

Sinais clínicos do sistema cardiovascular: (sopro, pulso, etc...);

Sinais clínicos do sistema nervoso: (convulsão, ataxia, nistagmo, etc...);

Sinais clínicos do sistema músculo esquelético: (algia, claudicação, etc...);

Sinais clínicos do sistema reprodutivo (prenhes, neoplasma mamário, secreção vaginal, etc...);

Sistema tegumentar (presença de pulgas, carrapatos, etc....);

## EXAME CLÍNICO GERAL

Mucosas (ocular-conjuntiva e esclera, oral, vaginal e prepucial);

Linfonodos (mandibular, cervical superficial, poplíteo, inguinais e escrotais);

Grau de hidratação;

Frequência cardíaca (min);

Pulso;

Frequência respiratória (min);

Ausculata cardiopulmonar;

Palpação abdominal;

Temperatura retal;

Condição corporal;