

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**TATIANI VITOR HARVEY**

**BABESIOSE E HEPATOOZONOSE EM CÃES DE ITUBERÁ,  
MICRORREGIÃO DE VALENÇA, BAHIA, BRASIL**

**ILHÉUS – BAHIA  
2015**

**TATIANI VITOR HARVEY**

**BABESIOSE E HEPATOOZONOSE EM CÃES DE ITUBERÁ,  
MICRORREGIÃO DE VALENÇA, BAHIA, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Santiago A. Carlos

**ILHÉUS – BAHIA  
2015**

H342

Harvey, Tatiani Vitor.

Babesiose e hepatozoonose em cães de Ituberá, microrregião de Valença, Bahia, Brasil / Tatiani Vitor Harvey. – Ilhéus, BA: UESC, 2015.

90f. : il.

Orientadora: Renata Santiago A. Carlos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências e apêndice.

1. Cão – Doenças – Ituberá (BA). 2. Carrapatos.  
3. Animais domésticos – Parasito. 4. Epidemiologia veterinária. I. Título.

CDD 636.70896

**TATIANI VITOR HARVEY**

**BABESIOSE E HEPATOOZONOSE EM CÃES DE ITUBERÁ,  
MICRORREGIÃO DE VALENÇA, BAHIA, BRASIL**

Ilhéus – BA, 27/02/2015.

---

Renata Santiago Alberto Carlos – *DSc*  
UESC/DCAA

---

*DSc*  
UESC/DCAA

---

*DSc*  
UESC/DCAA

**ILHÉUS – BAHIA  
2015**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus amados filhos Bella Ann Harvey e Jack Anderson Harvey, cujos sorrisos garantiram a execução de mais esta tarefa. Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, que sempre abençoa os meus passos e ilumina os meus dias.

A minha família pelo apoio incondicional e compreensão que me foram dados no decorrer deste trabalho e, especialmente, ao meu esposo Ford Harvey, pela ajuda com as crianças e com as traduções para a língua inglesa.

A minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup>. Renata Santiago Alberto Carlos por acreditar em mim e permitir o avanço de mais um degrau na construção do meu conhecimento.

Ao Professor Dr. Alexandre Dias Munhoz pela atenção ao tirar minhas dúvidas e pelos conselhos que me foram dados ao longo deste trabalho.

A todos que participaram direta ou indiretamente desta jornada, colaborando, criticando, ensinando, brincando e acompanhando o meu crescimento até aqui.

“A infecção em animais de companhia deve ser vista na perspectiva da diversidade das espécies de patógenos no que diz respeito às vias de transmissão e história natural”.

Gad Baneth

## BABESIOSE E HEPATOOZONOSE EM CÃES DE ITUBERÁ, MICRORREGIÃO DE VALENÇA, BAHIA, BRASIL

### RESUMO

Infecções por *Babesia* spp. e *Hepatozoon canis* são frequentes em cães do Brasil, onde apresentam alta prevalência em zonas urbanas e rurais, respectivamente, causando doença subclínica ou clínica em cães, podendo levá-los ao óbito ou potencializar enfermidades concomitantes. Objetivou-se com este trabalho verificar a prevalência destes agentes etiológicos na população canina do sudeste da Bahia, Brasil, tomando-se como modelo o município de Ituberá e verificar os possíveis fatores de risco associados. Foram coletadas amostras sanguíneas de 380 cães. Para *Babesia* foi feita pesquisa por esfregaço sanguíneo de sangue capilar, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sorologia pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Para *Hepatozoon canis* foi realizada a pesquisa por esfregaços sanguíneos e PCR. Dados epidemiológicos foram coletados através um questionário estruturado aplicado aos proprietários dos animais. Na citologia, apenas dois animais foram positivos para merozoítos de *Babesia canis* e nenhum gamonte de *H. canis* foi encontrado. Anticorpos anti-*Babesia canis* foram detectados em 140/380 (36,8%) cães. À PCR, 147/380 (38,7%) e 163/380 (42,9%) cães foram positivos para *Babesia* spp. e *H. canis*, respectivamente. Dos cães infectados por *Babesia* spp. e *H. canis*, 142 (63,6%) e 105 (64,4%) foram assintomáticos, respectivamente. A condição do cão semidomiciliado não dormir em casa ( $p=0,02$ ) foi considerada fator de risco para a babesiose. Conclui-se que os cães locais estão expostos à infecção causada por estes patógenos e que a alta prevalência observada para ambos os agentes etiológicos pode estar relacionada às características periurbanas desse município. Relatam-se os primeiros casos de infecção por *H. canis* no estado da Bahia.

**Palavras-chave:** Cães semidomiciliados. Carrapatos. Hemoparasitas. Epizootiologia. Nordeste Brasileiro.



**BABESIOSIS AND HEPATOOZONOSIS IN DOGS FROM THE  
MUNICIPALITY OF ITUBERÁ, MICROREGION OF VALENÇA, BAHIA,  
BRAZIL**

**ABSTRACT**

*Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* infections are common in dogs from Brazil, where they have a high prevalence in urban and rural areas, respectively, causing subclinical or clinic disease in dogs, which can lead to death or enhance concomitant diseases. The aim of this study was to determine the prevalence of these pathogens in the canine population of southeastern Bahia, Brazil, and test for associated risk factors. Blood samples were collected from 380 dogs. The research on *Babesia* infection was performed by peripheral blood smears, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). The research on *H. canis* infection was performed by peripheral blood smears and PCR. Epidemiological data were collected through a structured questionnaire applied to the dog owners. Cytology analysis revealed that only two animals were infected with *Babesia* merozoites. and no gamonte of *H. canis* was observed. Anti-*B. canis* antibodies were detected in 140 (36.8%) dogs. By PCR, 147 (38.7%) and 163 (42.9%) dogs were positive for *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis*, respectively. No clinical sings were found in 142 (63,6%) and 105 (64.4%) dogs infected with *Babesia* spp. and *H. canis*, respectively. The condition of the semi-restricted dogs not sleeping at home ( $p = 0.02$ ) was considered as a risk factor for babesiosis. In conclusion, local dogs have been exposed to infection by both pathogens. The high prevalence observed for both etiological agents can be related to the peri-urban features of this Municipality. Moreover, this study is reporting the first occurrence of subclinical hepatozoonosis in the State of Bahia by PCR.

**Palavras-chave:** Blood parasites. Epizootiology. Northeastern Brazil. Semi-restricted dogs. Ticks.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração		Página
Figura 1	Merozoítos de <i>Babesia</i> sp. em eritrócitos de cão.....	15
Quadro 1	Prevalência mundial de cães infectados por <i>Babesia canis</i> .....	22
Quadro 2	Prevalência de cães infectados por <i>Babesia canis</i> no Brasil...	24
Figura 2	Ciclo biológico do <i>Hepatozoon canis</i> . Adaptado de Baneth et al. (2001).....	31
Figura 3	A - Gamonte maduro de <i>H. canis</i> B – Meronte em desenvolvimento. Adaptado de O’Dwyer (2011) .....	32
Quadro 3	Prevalência mundial de cães infectados por <i>Hepatozoon canis</i> .....	37
Quadro 4	Prevalência de cães infectados por <i>Hepatozoon canis</i> no Brasil.....	39
Figura 4	Mesorregião do Sul da Bahia (a), Microrregião de Valença (b), Município de Ituberá (c), Estado da Bahia.....	47
Figura 5	Detecção de <i>Babesia</i> spp. pela PCR. Amplificação de uma região de 490 pb, referente ao gene 18S rRNA, realizada com os <i>primers</i> Bab7 e Bab 9. Linha 1: Marcador Molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Linha 2: controle positivo. Linha 3 a 5: amostras sanguíneas positivas para <i>Babesia</i> spp. Linha 6 e 7: amostras negativas. Linha 8: controle negativo.....	51
Figura 6	Comparação de prevalência entre os métodos diagnósticos....	51
Figura 7	Mesorregião do Sul da Bahia (a), Microrregião de Valença (b), Município de Ituberá (c), Estado da Bahia.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Fatores de risco para a infecção por <i>Babesia</i> ssp. em cães do sudeste da Bahia, Brasil.....	53
2	Fatores de risco para a infecção por <i>Hepatozoon canis</i> em cães do sudeste da Bahia, Brasil.....	64

## SUMÁRIO

		Pag.
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>3.1</b>	<b>Babesiose Canina</b> .....	14
3.1.1	Etiologia e Taxonomia.....	14
3.1.2	Ciclo Biológico e Transmissão.....	15
3.1.3	Patogenia e Patologia.....	16
3.1.4	Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais.....	18
3.1.5	Epidemiologia.....	21
3.1.6	Diagnóstico.....	25
<b>3.2</b>	<b>Hepatozoonose Canina</b> .....	29
3.2.1	Etiologia, Taxonomia e Histórico.....	29
3.2.2	Ciclo Biológico e Transmissão.....	30
3.2.3	Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais.....	34
3.2.4	Epidemiologia.....	36
3.2.5	Diagnóstico.....	41
3.2.6	Considerações sobre zoonose.....	43
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I</b> .....	44
<b>4.1</b>	<b>Introdução</b> .....	45
<b>4.2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	46
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b> .....	50
<b>4.4</b>	<b>Discussão</b> .....	53
<b>4.5</b>	<b>Conclusões</b> .....	56
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II</b> .....	57
<b>5.1</b>	<b>Introdução</b> .....	58
<b>5.2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	59
<b>5.3</b>	<b>Resultados</b> .....	62
<b>5.4</b>	<b>Discussão</b> .....	64
<b>5.5</b>	<b>Conclusões</b> .....	68
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>APÊNDICE</b> .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por carrapatos são frequentes em regiões de clima tropical e subtropical, incluindo o Brasil. Neste país, ecorregiões da Mata Atlântica, como as Florestas Costeiras da Bahia, onde situa-se o município de Ituberá, apresentam condições climáticas favoráveis à dispersão biogeográfica de hemoparasitos, bem como dos seus vetores e, conseqüentemente, o estabelecimento de hemoparasitoses, como os agentes etiológicos da babesiose e hepatozoonose caninas.

A babesiose canina é endêmica no país, sendo a *Babesia canis vogeli* a principal espécie encontrada nos cães brasileiros, com alta prevalência em centros urbanos, enquanto a hepatozoonose canina foi relatada em diversos estados, apresentando alta prevalência em áreas rurais. Além disso, em quaisquer destas áreas, estes parasitos têm sido associados ao carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*.

Embora a baixa patogenicidade dos parasitos observada nestes locais, conforme dados da literatura, a presença de *Babesia* ssp. e *Hepatozoon canis*, associada, ou não, a doenças concomitantes ou a outros hemoparasitos, pode culminar em doença grave, levando o paciente ao óbito ou potencializar a patogenia de agentes etiológicos coinfectantes com maior relevância clínica.

O Brasil, bem como a região nordeste brasileira e, mais especificamente, o estado da Bahia, carecem de dados epizootiológicos sobre ambas as doenças, principalmente, no que se refere a *Hepatozoon canis*, o qual ainda não fora assinalado nesta região.

Desta forma, uma vez que *Babesia* ssp. foram identificadas, outrora, em cães da região nordeste, no Piauí e Maranhão, e em carrapatos de cães no Maranhão e no Rio Grande do Norte, além de terem sido identificadas em cães oriundos das cidades de Ilhéus e Itabuna, no sudeste da Bahia, torna-se, assim, pertinente a identificação de ambos os agentes etiológicos e dos possíveis fatores de risco para estas infecções no município de Ituberá, o que contribuirá com mais dados epidemiológicos para uma melhor compreensão desses hematozoários nessa região.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a prevalência de *Babesia* spp. e *Hepatozoon canis* em cães provenientes da região de Ituberá e a associação com possíveis fatores de risco.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Babesiose canina

##### 3.1.1 Etiologia e Taxonomia

A Babesiose Canina (BC) é uma hemoparasitose transmitida por carrapatos, causada por protozoários intraeritrocitários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmida, família Babesiidae, gênero *Babesia*, associada a alta incidência do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* (MURASE et al. 1993; VIDOTTO; TRAPP, 2004). Acomete espécies domésticas, silvestres e o homem (BOOZER; MACINTIRE, 2003), sendo considerada como uma zoonose (OLICHESKI, 2003).

A espécie *Babesia canis* apresenta é constituída por três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*. A diferenciação entre estas subespécies baseia-se na especificidade do vetor, imunidade cruzada e patogenicidade (UILENBERG, 2006). Porém, estas subespécies são reconhecidas como espécies, conforme artigo publicado por Irwin (2010), o qual afirma que, atualmente, são conhecidas oito espécies, morfologicamente distintas, incluindo *B. gibsoni*, *B. conradae*, *B. microti-like* sp., *Babesia vogeli*, *Babesia canis*, *Babesia rossi*, e duas outras espécies, uma grande *Babesia* sp., não nomeada, detectada na Carolina do Norte, e outra grande espécie não nomeada detectada no Reino Unido, que infectam cães domésticos (SCHETTERS et al., 1997; ZHALER et al., 2000; MIYAMA et al., 2005; HOLM et al., 2006; IRWIN, 2010; SIKORSKI et al., 2010; KELLY et al., 2013). Tal mudança, já há alguns anos, vinha sendo sugerida em relação a *Babesia canis vogeli*. No Brasil, esta é a principal espécie relatada em cães (CARRET, et al., 1999; TRAPP; MORAIS; VIDOTTO, 2004, PASSOS et al., 2005; VILELA et al., 2013).

Quanto à caracterização morfológica do agente etiológico (Figura 1), com base no tamanho relativo dos merozoítos, as espécies de *Babesia* são classificadas em grandes ou pequenas. Devido a sua forma aparente de pêra, à microscopia, recebeu a denominação de piroplasma, bem como o gênero *Theileria* (IRWIN, 2010). *Babesia canis*, uma espécie grande, mede entre 3-5µm e possui, aproximadamente, o dobro do

tamanho da *B. gibsoni*, a qual mede entre 0,5-2,5µm. Os merozoítos de *B. canis* são pelomórficos, sendo observadas formas arredondadas, piriformes, elípticas, em cruz ou irregular, ocorrendo, usualmente, em pares. Contudo, pode-se observar oito ou mais merozoítos no mesmo eritrócito (IRWIN, 2009; LOBETTI, 1998). Os merozoítos de *B. gibsoni* possuem, comumente, a forma oval. Porém, são, também, pleomórficos, podendo apresentar-se em formato de anel. (TABOADA; MERCHANT, 1997).

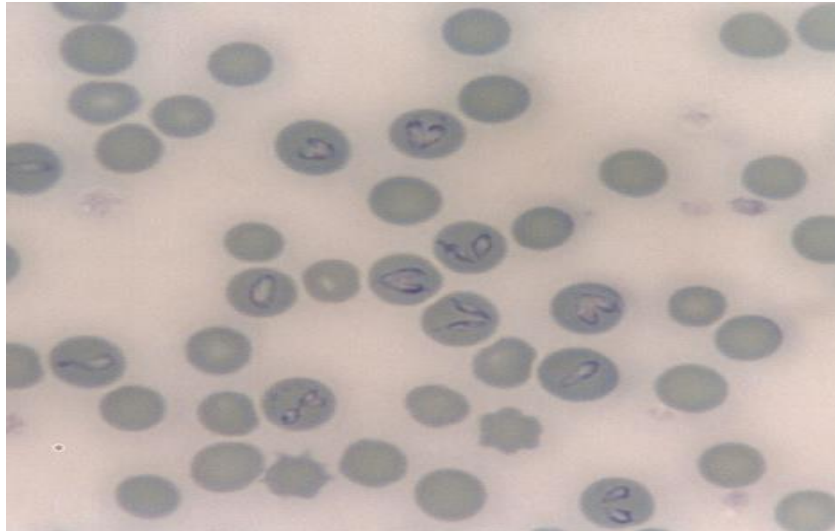


Figura 1 – Merozoítos de *Babesia canis* em diversas fases de desenvolvimento em eritrócitos de cão. Giemsa. Obj.100X  
Fonte: Dr<sup>a</sup>. Renata Santiago Alberto Carlos/UESC

### 3. 1.2 Ciclo Biológico e Transmissão

O ciclo biológico inicia-se com a ingestão de sangue de um cão infectado pelo carrapato *R. sanguineus*, o qual infecta-se com eritrócitos contendo diferentes estádios evolutivos de *B. canis*. Nas células intestinais do carrapato, alguns merozoítos dão origem a gametócitos, e depois em corpos raiados (esflagelação). Há fusão do gameta masculino e feminino, dando origem aos zigotos que se transformam em oocinetos móveis. Estes atravessam a parede intestinal do carrapato, invadindo a cavidade geral e por esporogonia transformam-se em esporocinetos, infectando diversos órgãos do carrapato, incluindo glândulas salivares e ovários. No ovário, os esporocinetos invadem os ovos que darão larvas positivas, permitindo a transmissão transovariana. A esporogonia continua a ocorrer tanto nas glândulas salivares, quanto nas larvas oriundas dos ovos infectados, dando origem a milhares de esporozoítos que serão transmitidos a outros hospedeiros no momento do repasto sanguíneo, pelos carrapatos adultos, larvas



ou ninfas (VIDOTTO; TRAPP, 2004; UILENBERG, 2006). Segundo Chauvin et al. (2009) a perpetuação da capacidade vetorial é assegurada pelas transmissões transovarianas e transestadiais.

No cão, o ciclo biológico inicia-se com a inoculação de esporozoítos pelo carrapato, durante o repasto sanguíneo. Na circulação sanguínea, os esporozoítos aderem-se à membrana dos eritrócitos e os invadem, sendo, então, denominados trofozoítos. A partir daí, sofrem divisão binária ou eventualmente múltipla, podendo originar de dois a 32 parasitas que são denominados merozoítos. Os merozoítos deixam as células hospedeiras, rompendo-as ou não, ficam livres na circulação e invadem outros eritrócitos. Essa multiplicação assexuada repete-se várias vezes até que o sistema imune do hospedeiro interfira no desenvolvimento do parasito (BOURDEAU; GUELFY, 1995; MASSARD et al., 1981; UILENBERG, 2006).

O carrapato *R. sanguineus* é o vetor principal da infecção (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001; SILVA et al., 2012), porém *B. canis* já foi relatada parasitando os carrapatos *Haemaphysalis leachi* (LEWIS et al., 1996), *Amblyomma cajannense* e *Dermacentor reticulatus* (SVEHLOVÁ et al., 2014).

### 3.1.3 Patogenia e Patologia

A infecção pela *Babesia* sp. é acomete vários sistemas e leva a quadros hemolíticos gerados por diferentes mecanismos, resultando em anemia regenerativa, hemoglobinemia, hemoglobinúria e bilirrubinúria. Uma causa seria a ação mecânica do parasito nos eritrócitos parasitados, o que caracteriza a hemólise intravascular. Eritrócitos não parasitados são marcados por antígenos da *Babesia*, os quais se aderem à membrana e são reconhecidos por anticorpos, o que pode desencadear anemia hemolítica auto-imune (ADACHI et al., 1995; BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; JACOBSON, 2006). Desta maneira outros mecanismos que levam à hemólise de células não infectadas, como o estresse oxidativo decorrente da ação de toxinas hemolíticas, e mecanismos imunomediados, os quais levam à hemólise intra e extravascular, vêm sendo propostos (CARLI et al., 2009). Anemia hemolítica foi observada em animais jovens infectados com *Babesia vogeli* (SOLANO-GALEGO et al., 2008). Porém,

embora a hemólise seja um processo comum a este gênero, Carli et al. (2009) relataram ausência de anemia hemolítica em infecção por *B. c. canis*.

Alguns autores afirmam que o grau de anemia não é proporcional ao nível de parasitemia, uma vez que, em infecções agudas este se mantém, normalmente baixo.

Atualmente, classifica-se a patogênese da doença como complicada ou não complicada. A babesiose não complicada está, normalmente, associada à manifestação leve a moderada dos sinais clínicos. Já a babesiose complicada relaciona-se às manifestações mais severas as quais não podem ser explicadas apenas pela hemólise, caracterizando-se por lesões em um ou mais órgãos e alta letalidade, como é observado em infecções por *B. rossi* (JACOBSON, 2006; MATIJATKO et al., 2010).

O rompimento dos eritrócitos desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios de ação sistêmica levando à Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), a qual gera hipotensão em quadros hemolíticos severos, favorecendo a interação entre eritrócitos infectados e tecido endotelial, bem como à agregação eritrocitária (SCHETTERS et al., 1998; VALLI, 2007; SCHETTERS et al., 2009). A SIRS pode desencadear anemia hemolítica imunomediada, culminando na Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), determinando maior gravidade da doença (BOURDEAU; GUELFY, 1995; WELZL, 2001). A SDMO deve-se à hipóxia gerada pela anemia, a qual leva à redução da oxigenação tecidual, ocorrendo, principalmente, nos rins, fígado, músculo, pulmão e cérebro (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; MATIJATKO et al., 2010).

Na fase aguda da doença, o quadro inflamatório sistêmico, a hipotensão, o déficit dos mecanismos de coagulação e a SDMO podem estar presentes, desencadeando manifestações clínicas graves, como insuficiência renal aguda e Síndrome da Angústia Respiratória (SCHETTERS et al., 2009; MATIJATKO et al., 2010).

Alterações renais têm sido associadas à infecção por *Babesia*. A hemólise severa pode resultar em lesão tubular, nefrite intersticial e glomerulopatia. Além disso, a deposição de imuno-complexos nas paredes dos capilares glomerulares, decorrentes do mecanismo auto-imune, leva à glomerulonefrite o que pode culminar em alterações renais como insuficiências agudas ou crônicas, além de Síndrome Nefrótica (CAMACHO et al., 2005).

A patogênese das alterações neurológicas está relacionada ao acúmulo de eritrócitos parasitados que são sequestrados nos capilares do Sistema Nervoso Central, liberando mediadores inflamatórios e levando à hipóxia tecidual, determinando aparecimento de sinais neurológicos como, por exemplo, convulsões, incoordenação motora, movimentos de pedalagem, coma e paralisia dos membros pélvicos (BOURDEAU; GUELFY, 1995; McGAVIN; ZACHARY, 2009; IRWIN, 2010). A histologia revela eritrócitos infectados obstruindo os capilares cerebrais, além de microtrombos em diversos tecidos do animal (VALLI, 2007) a semelhança da infecção por *Babesia bovis* em bovinos (LOPES, 1976)

Segundo Levine (1985), na necropsia, pode-se observar emaciação, icterícia, edema, hemorragias, esplenomegalia, hepatomegalia e coagulação intravascular disseminada (CID), característica de quadros graves. Além disso, o baço pode apresentar polpa vermelha hiperêmica e corpúsculos proeminentes; os rins podem apresentar coloração marrom escura; o fígado pode apresentar coloração marrom-amarelado; a bile pode estar mais espessa e abundante.

Quanto à patogenicidade, segundo Miyama et al. (2005), os sinais clínicos são mais graves em infecções causadas por *B. gibsoni* em relação aos sinais clínicos causados por *B. canis*, como pode ser observado no Japão. Em relação às subespécies de *B. canis*, *B. canis vogeli* apresenta patogenicidade moderada e está, comumente, associada às infecções subclínicas. *Babesia canis canis* possui patogenicidade variável e, normalmente, responde à terapia medicamentosa. *Babesia canis rossi* apresenta maior patogenicidade levando, frequentemente, os cães ao óbito (UILENBERG et al., 1989; ZAHLER et al., 1998).

### 3. 1. 4 Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais

Os sinais da babesiose canina devem-se, em sua maioria, à anemia hemolítica e à SRIS, as quais ocorrem paralelamente, com o desenvolvimento subsequente da SDMO (BOOZER; MACINTIRE, 2003; TABOADA; LOBETTI, 2006).

De acordo com Kordick et al. (1999), a variabilidade dos sinais clínicos e grau de severidade são determinados pela espécie envolvida na infecção, bem como por fatores como idade, condição imune do hospedeiro e presença de coinfeções.

No exame físico pode-se encontrar um baço aumentado à palpação, que pode ser confirmado ultrassonograficamente. Febre pode ser observada (sustentada ou intermitente), leve hepatomegalia, petéquias e equimoses (TRAPP; MORAIS; VIDOTTO, 2004). Anorexia, letargia e vômito são comumente observados, além de hematúria, icterícia e linfadenomegalia. Na fase crônica pode-se observar diminuição do apetite e depleção considerável do estado físico (BOURDEAU; GUELFY, 1995).

Diversos são os sinais clínicos decorrentes da infecção, a exemplo de icterícia, a qual deve-se à alta destruição de hemácias, levando a uma sobrecarga no fígado; de espleno e hepatomegalia, decorrentes de congestão e da hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear; de pirexia, devido à liberação de pirógenos (ETTINGER, 1992; ALMOSNY et al., 2002).

A doença pode manifestar-se de forma hiperaguda, aguda, subclínica ou crônica (ABDULLAHI et al., 1990), compreendendo sinais clínicos como letargia, anorexia, palidez de mucosa, perda de peso, vômito, anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria, esplenomegalia, febre, desidratação, taquicardia, taquipnéia, convulsão e alteração de consciência, com maior gravidade em cães mais jovens (TRAPP et al., 2004; ABD RANI et al., 2010). Nefropatias podem ocorrer devido à deposição de pigmentos férricos nos rins (ALMOSNY et al., 2002).

A forma hiperaguda é rara e mais observada em filhotes, podendo observar-se SIRS, CID, hemoglobinúria e icterícia. A forma aguda é mais observada em infecções por *B. gibsoni* e *B. c. rossi*, apresentando sinais como trombocitopenia, icterícia, esplenomegalia e hemoglobinúria, além de febre (LEISEWITZ et al., 2001). A forma crônica ocorre na maioria dos casos, e, de forma geral, estes casos são assintomáticos, caracterizando-se pela baixa parasitemia e, na presença de agentes estressores, pode manifestar quaisquer dos sinais anteriormente citados (ALMOSNY et al., 2002; IRWIN, 2010). Esta forma é conhecida como “estado de premunição”, no qual ocorre a manutenção do parasito no organismo, na ausência de sinais clínicos, apresentando alta titulação de anticorpos *anti-B. canis*. Além disso, percebe-se uma aparente resistência a infecções subsequentes (IRWIN, 2010). Atualmente, não se sabe o tempo em que um portador crônico pode permanecer infectado, tratando-se de uma infecção, possivelmente, por toda a vida (IRWIN, 2010). Na forma subclínica, predominante nas

infecções relatadas no Brasil, observam-se cães aparentemente normais ao exame físico, além de, comumente, serem negativos no exame parasitológico direto (MAIA et al., 2007). Tal condição é intrínseca à manutenção do parasito, uma vez que estes animais são fontes de infecção, principalmente para filhotes e cães que recebem transfusão sanguínea (TABOADA, 1998).

Na babesiose complicada, os sinais clínicos são variáveis e, devido ao comprometimento de alguns órgãos, pode-se observar, anemia hemolítica, coagulopatia, icterícia, insuficiência renal aguda, síndrome da angústia respiratória aguda, lesões miocárdicas como miocardite aguda e necrose do miocárdio, sinais neurológicos, como movimentos de pedalagem, convulsões e paralisia dos membros pélvicos, hemoconcentração e choque (LOBETTI et al., 2002; LOBETTI, 2005).

Em relação às alterações laboratoriais, normalmente se observa anemia regenerativa, níveis normais de proteínas plasmáticas, trombocitopenia moderada a grave e alterações leucocitárias (SIKORSKI et al., 2010). No entanto, o eritrograma pode ser normal em alguns casos crônicos (IRWIN, 2010). A anemia pode ser normocítica normocrômica (FURLANELLO et al., 2005) podendo tornar-se macrocítica hipocrômica com o avanço da doença (GUIMARÃES et al., 2004). Segundo Carli (2009), nas infecções por *B. c. canis* observa-se anemia não regenerativa, ao contrário do que ocorre nas infecções por *B. c. vogeli*, no qual se observa anemia regenerativa. Policromasia, anisocitose, diminuição do volume globular e reticulocitose podem ocorrer, proporcionalmente à gravidade da anemia (GUIMARÃES et al., 2004).

No que se refere ao leucograma, podem ocorrer leucocitose ou leucopenia (GUIMARÃES et al., 2004; SCHETTERS et al., 2009).

Embora a trombocitopenia seja um achado bastante frequente, não é comum observar-se coagulopatia, à exceção da presença de CID ou em casos de coinfeções com *E. canis*, por exemplo (KORDICK et al., 1999). Esta alteração pode dever-se ao sequestro esplênico, aos mecanismos de destruição imunomediados, ao consumo de plaquetas decorrente de lesões hemolíticas e vasculares (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; TABOADA; LOBETTI, 2006) e à liberação de mediadores inflamatórios durante a lise dos eritrócitos (JEFFERIES et al., 2007).

Quanto à urinálise, pode observar-se hemoglobinúria, com ou sem proteinúria, cilindrúria granular, além de células do epitélio renal, as quais indicam lesão renal aguda, decorrente da hipoperfusão renal e hemoglobinúria (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

Alterações bioquímicas são inespecíficas, observando-se aumentos nas concentrações de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina. Bilirrubinemia e azotemia são observadas com frequência (IRWIN, 2010).

### 3.1.5 Epidemiologia

A ocorrência de *B. canis* é cosmopolita e ocorre mundialmente, distribuindo-se, tanto em regiões tropicais e subtropicais (TABOADA et al., 1992; GUIMARÃES et al., 2009), quanto temperadas (CRIADO-FORNELIO et al., 2003), sendo assinalada nos cinco continentes (Quadro 1), com taxas de prevalência variadas. A presença da infecção relaciona-se com a presença do vetor e a sua prevalência varia de acordo com o local, o tipo de população e o método diagnóstico utilizado (TABOADA et al., 1992).

A respeito da distribuição geográfica das subespécies, *B. c. vogeli* apresenta um perfil cosmopolita, associando-se à presença de *R. sanguineus* (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003); a *B. c. canis* predomina em áreas temperadas e associa-se ao carrapato *D. reticulatus* (FOLDVARI et al., 2005); *B. c. rossi* é mais prevalente na África, estando associada ao carrapato *Haemaphysals leachi* (OYAMADA et al., 2005). *B. gibsoni* é encontrada predominantemente na Ásia (MIYAMA et al., 2005) e, com menor frequência, na América do Norte (BIRKENHEUER et al., 2005), África (MITJILA et al., 2007), Europa (YISASCHAR-MEKUZAS et al., 2013), Austrália (JEFFERIES et al., 2003) e Sul do Brasil (JOJIMA et al., 2008), associada aos vetores *H. longicornis*, na maioria dos casos, e *R. sanguineus*. *Babesia microti-like*, a qual parasita raposas, cães e gatos, restringe-se à Espanha, Portugal e norte dos Estados Unidos, associando-se aos vetores *R. sanguineus* e *Ixodes* spp. (CAMACHO et al., 2001). *B. conradae* foi relatada apenas na Califórnia, Estados Unidos (KJENTRUP et al., 2006).

Quadro 1 – Prevalência mundial de cães infectados por *Babesia canis*.

Continente	País	Método Diagnóstico	Número de animais	Número de infectados (%)	Referência
<b>América</b>	Brasil	PCR	300	3,3	Silva et al. (2012)
		RIFI	91	51,6	
	Colômbia	PCR	91	5,5	Vargas-Hernández et al. (2012)
	Costa Rica	PCR	146	8	Rojas et al. (2014)
	Estados Unidos	ELISA/RIFI	14.496	1,1	Yancey et al. (2014)
	St. Kitts	PCR	372	12	Kelly et al. (2013)
		Citologia	134	0,7	
<b>África</b>	Venezuela	PCR	134	2,2	Criado-Fornelio et al (2007)
	Nigéria	PCR-RLB	100	39	Adamu et al. (2014)
	Sudão	PCR	78	8,9	Oyamada et al. (2005)
<b>Ásia</b>	Índia	PCR	525	5,5	Abd Rani et al. (2011)
<b>Austrália</b>	Austrália	PCR	215	10	Brown et al. (2006)
<b>Europa</b>	Alemanha	RIFI	1.138	23,4	Menn et al. (2010)
	Lituânia	Citologia	123	76,4	
		PCR	123	87,8	Paulauskas et al. (2014)

Outras duas espécies, ainda não nomeadas, incluem uma grande *Babesia* semelhante à *B. c. vogeli*, identificada em alguns estados americanos em cães imunossuprimidos (SIKORSKI et al., 2010) e uma outra grande espécie identificada no Reino Unido (HOLM et al., 2006)

No Brasil, a babesiose canina é endêmica, distribuindo-se na maioria das regiões (Quadro 2), com alta prevalência em determinadas áreas (BASTOS et al., 2004; DANTAS-TORRES, 2008), a qual varia de acordo com a região, população estudada e teste utilizado (TABOADA, 1998). *B. c. vogeli* é detectada na maioria dos estudos (GUIMARÃES et al., 2009; SPOLIDORIO et al., 2011; SILVA et al., 2012), havendo relatos de *Babesia gibsoni*, no sul do país (TRAPP et al., 2006; JOJIMA et al., 2008).

O carrapato *R. sanguineus* é o principal vetor da doença, como pôde ser demonstrado em estudos como os de Silva et al. (2012), no Maranhão e de Gonçalves et al. (2014), no Rio Grande do Norte, nos quais *B. canis* foi identificada nestes vetores.

A variabilidade da prevalência, devido à utilização de diferentes técnicas de diagnóstico pode ser observada, também, em trabalhos como o de Abd Rani et al. (2011) em que a *Babesia* não foi detectada na análise de 525 esfregaços sanguíneos, porém foi identificada em 5,7% das amostras, pela PCR, indicando a necessidade da associação de métodos diagnósticos, a fim de não subestimar a ocorrência da doença.

Na Bahia, Carlos et al. (2006) observaram *B. canis* em esfregaço sanguíneo em 6,9% dos 101 cães avaliados no município de Ilhéus e em 9% dos 100 cães avaliados no município de Itabuna. Em Salvador e região metropolitana, Ungar de Sá et al. (2007) visualizaram o parasita em 33,9% das 7.243 amostras de esfregaço sanguíneo analisadas. Salienta-se que esses autores apenas identificaram o gênero, assim como foi observado em diversos estudos pelo país como o de Albuquerque et al. (2008), na Bahia, Miranda et al. (2008), no Rio de Janeiro, Santos et al. (2009), em São Paulo e Silva et al. (2014), em Minas Gerais.



Quadro 2 – Prevalência de cães infectados por *Babesia canis* no Brasil

Região	Estado	Método Diagnóstico	Animais do estudo	Número de infectados (%)	Referência
Centro-Oeste	Goiás	Citologia	890	3,9	Duarte et al. (2011)
		PCR	35	48,7	
	Mato Grosso do Sul	RIFI	60	81,6	Sousa et al. (2013)
		PCR	60	3,3	
	Goiás	Citologia	53	11,1	Mundim et al. (2008b)
Nordeste	Maranhão	PCR	300	3,3	Silva et al. (2012)
	Piauí	Citologia	315	2,2	Braga (2011)
		RIFI	315	48,5	
		PCR	315	4,7	
Bahia	Citologia	201	7,9	Carlos et al. (2006)	
Sudeste	Espírito Santo	PCR	92	21,7	Spolidorio et al. (2010)
	Rio de Janeiro	PCR	103	0,97	Lemos et al. (2012)
	São Paulo	Citologia	222	5,9	O'Dwyer et al. (2006)
Sul	Paraná	RFLP-PCR	105	23,4	Jojima et al. (2008)

*Babesia canis* tem sido comumente relatada como um dos agentes de coinfeccções simples ou múltiplas, em cães, como foi observado em estudos como o de Kelly et al., 2013, em St. Kitts (Caribe), onde encontrou-se associada à *Ehrlichia canis*, *B. gibsoni* e *Hepatozoon canis*; de Ramos et al. (2014), na Itália, onde associou-se a *Cercopithifilaria baina* e *Anaplasma platys*; de Kamani et al. (2013), na Nigéria, onde observou-se associação da *B. c. rossi* com *Rickettsia* sp. e de Sousa et al. (2013), no Mato Grosso do Sul, Brasil, onde estava associada a *Leishmania* spp.

Quanto aos fatores de risco, diversos estudos não apontam associação entre as variáveis sexo e raça e a infecção por *B. canis* (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2012). No entanto, cães da raça Greyhound parecem ser mais suscetíveis à infecção por *B. canis*, enquanto a *B. gibsoni* é mais encontrada em cães da raça Pit Bull (DUARTE et al., 2011; TRAPP et al., 2004).

Em relação à faixa etária, estudos indicam maior prevalência em animais adultos (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2012; TRAPP et al., 2006). No entanto, em outros estudos não se observou associação entre esta variável e a presença do agente (UNGAR DE SÁ et al., 2007).

Em relação ao local, embora a babesiose seja prevalente nas áreas urbanas, relacionando-se com a presença do *R. sanguineus*, estudos têm mostrado o estabelecimento da doença em áreas rurais (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2014). No entanto, estudos como o de Silva et al. (2014) não demonstraram diferença entre infecções em áreas urbanas e rurais.

### 3.1.6 Diagnóstico

A manifestação de qualquer sinal clínico associado à babesiose canina e a presença de anemia e/ou trombocitopenia levam à suspeita da doença, devendo-se considerar, também, o histórico de exposição ao vetor (IRWIN, 2010).

Os métodos utilizados para diagnóstico da babesiose canina baseiam-se na observação direta do agente ou de seus componentes, na detecção de anticorpos e na amplificação do seu DNA pela PCR (FUKUMOTO et al., 2001; TABOADA, 1998).

O agente pode ser visualizado diretamente nos eritrócitos, em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa ou pela coloração de Romanowsky. A não detecção do

parasita no esfregaço sanguíneo não implica em ausência da infecção (TRAPP et al, 2004a). O esfregaço sanguíneo, método de rotina, é útil para distinguir piroplasmas intraeritrocitários em pequenas e grandes babesias, a exemplo da *B. gibsoni* (0,5-2,5 mm) e da *B. canis* (3-5 mm), respectivamente. Apesar de ser um método de fácil execução e com boa especificidade, possui baixa sensibilidade em razão da variação da parasitemia, conforme a apresentação clínica da doença (COSTA-JÚNIOR et al, 2009; VIDOTTO; TRAPP, 2004; UNGAR DE SÁ et al, 2007). Segundo Urquhart et al. (1998), a parasitemia pode ser observada entre 0,2 a 45% dos eritrócitos, dependendo da espécie envolvida.

A utilização da primeira gota de sangue capilar da ponta de orelha para a preparação do esfregaço sanguíneo possibilita uma maior sensibilidade ao método. Tal situação ocorre devido à peroxidação lipídica da membrana do eritrócito causada pelo parasito, a qual leva à deformidade das hemácias infectadas e conseqüente acúmulo destas células em vasos de menor calibre (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

Ribeiro et al. (1990) demonstraram a vantagem da utilização de amostra de sangue de ponta de orelha sobre o sangue venoso, ao verificarem uma parasitemia de 23% em sangue capilar, em contraste com uma parasitemia de 3% em sangue venoso de um cão. Tal observação indica a existência de dados subestimados e comprova a necessidade do uso associado de outros métodos diagnósticos.

Embora algumas vezes seja fácil encontrar o parasito em animais agudamente infectados, eles são raramente evidentes em animais com infecção crônica ou em portadores assintomáticos. Em portadores assintomáticos, a parasitemia, geralmente, não é detectada, porque poucos merozoítas estão presentes no sangue periférico ao mesmo tempo, sendo necessário utilizar pesquisas de anticorpos, utilizando-se provas sorológicas (TRAPP et al., 2004a) ou moleculares (FUKUMOTO et al., 2001). A detecção da *Babesia* na citologia confirma o diagnóstico e auxilia na escolha do tratamento a ser escolhido, uma vez que permite diferenciação morfológica das espécies (IRWIN, 2010).

A variabilidade da prevalência, devido à utilização de diferentes técnicas de diagnóstico pode ser observada, também, em trabalhos como o de Abd Rani et al. (2011) em que a *Babesia* não foi detectada na análise de 525 esfregaços sanguíneos, porém foi

identificada em 5,7% das amostras, pela PCR, indicando a necessidade da associação de métodos diagnósticos, a fim de não subestimar a ocorrência da doença.

Na Bahia, Carlos et al. (2006) observaram *B. canis* em esfregaço sanguíneo em 6,9% dos 101 cães avaliados no município de Ilhéus e em 9% dos 100 cães avaliados no município de Itabuna. Em Salvador e região metropolitana, Ungar de Sá et al. (2007) visualizaram o parasita em 33,9% das 7.243 amostras de esfregaço sanguíneo analisadas. Salienta-se que esses autores apenas identificaram o gênero, assim como foi observado em diversos estudos pelo país como o de Albuquerque et al. (2008), na Bahia, Miranda et al. (2008), no Rio de Janeiro, Santos et al. (2009), em São Paulo e Silva et al. (2014), em Minas Gerais.

Outra técnica diagnóstica é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizada no diagnóstico indireto da babesiose canina, detectando anticorpos séricos em animais portadores (PAULAN et al., 2013; VIEIRA et al., 2013; WLOSNIIEWSKI et al., 1997) ou com infecções crônicas que mantêm parasitemia baixa ou indetectável. A RIFI é uma técnica altamente sensível, porém tem moderada especificidade devido à ocorrência de reações cruzadas entre as espécies de *Babesia*, exposição prévia ao parasito, permanência de anticorpos colostrais em filhotes até os cinco meses de idade e irreversibilidade do status sorológico do cão após autoesterilização ou quimioesterilização (LEVY et al., 1987; MAIA et al., 2007). Além disso, anticorpos contra as novas espécies de *Babesia*, recentemente encontradas, podem não ser identificados com os protocolos atuais, levando à redução da sensibilidade (BECK et al., 2009). Na fase inicial da infecção, a RIFI pode ser negativa, pois são necessários até 15 dias para a produção de anticorpos. Neste caso, é recomendado repetir o exame após quatro semanas (BOURDEAU; GUELFY, 1995; TABOADA, 1998).

A técnica de ELISA também é utilizada para detecção de anticorpos contra *Babesia* spp. em cães, sendo comumente usada em estudos epidemiológicos. É uma técnica simples e sensível, porém pouco específica devido à possibilidade de ocorrência de reação cruzada entre diferentes espécies (BOURDEAU; GUELFY, 1995; ZANETTE et al., 2014). Recentemente, o novo antígeno (BgP22) mostrou-se útil na diferenciação entre *B. gibsoni* e *B. canis* e na detecção de infecções por *B. gibsoni* (GOO et al, 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada para detectar fragmentos de DNA de espécies do gênero *Babesia*. (FUKUMOTO et al., 2001; KELLY et al., 2013). De acordo com Irwin (2010) seu uso é fundamental para o diagnóstico de infecções causadas por parasitos muito pequenos ou em baixa parasitemia, os quais não podem ser identificados pelos métodos convencionais. Esta técnica é sensível, específica, rápida e simples para o diagnóstico de infecção para várias espécies do gênero *Babesia*. A PCR proporciona a identificação do agente em infecções agudas, subclínicas ou crônicas, mesmo nos casos de baixa parasitemia (DUARTE et al., 2011; MACINTIRE et al., 2002). Além disso, a análise molecular das sequências alvo permite a distinção de espécies e subespécies de *Babesia* tornando-se de relevada importância para o estudo da distribuição e prevalência da doença (SASAKI et al., 2008).

Segundo Miyama et al. (2005), é importante salientar que a positividade no PCR implica na existência de protozoários no sangue periférico, ou seja, no caso de uma infecção em curso. Por outro lado, positividade nos testes de RIFI e ELISA implica na existência de anticorpos contra o agente, o que demonstra que estes testes podem detectar tanto infecções passadas como infecções correntes. Contrariamente, cães negativos na PCR e ELISA têm uma baixa probabilidade de terem sido infectados. Contudo, casos de positividade na PCR com negatividade no ELISA ou RIFI podem indicar as seguintes situações: estágio inicial da infecção, antes da formação de anticorpos; baixa produção de anticorpos devido à terapia imunossupressora ou à doença que gera condições imunossupressivas. Casos de negatividade na PCR com positividade no ELISA ou RIFI indicam que os animais foram expostos à infecções prévias, com produção de anticorpos de longa duração, embora os antígenos no sangue periférico estejam abaixo do limite de detecção pela PCR. Outra possibilidade, neste caso, seria a distribuição dos parasitos nos órgãos, embora sua presença em baixa taxa no sangue periférico.

Em relação ao diagnóstico diferencial, deve-se incluir rangeliose e ehrlichiose monocitotrófica aguda, as quais apresentam achados clínicos e hematológicos associados à anemia hemolítica. A esplenomegalia pode, também, levar à suspeita de leptospirose. Deve-se considerar que, na ehrlichiose, a icterícia não é um achado comum. A hepatozoonose também deve ser considerada, porém hemoglobinúria e

icterícia não são característicos, nesta doença. Além disso, helmintoses também devem ser descartadas (ABDULLAHI; SANNUSI, 1998). De acordo, Sousa et al. (2013), a leishmaniose também deve ser incluída entre as doenças suspeitas, uma vez que algumas de suas manifestações clínicas e hematológicas são similares às manifestações clínicas da babesiose. Um dado importante para diferenciação de outros agentes é que *Babesia* spp. não são parasitas teciduais (FIGHERA et al., 2010).

A respeito do diagnóstico diferencial de anemia hemolítica em cães, Irwin (2010) menciona, para cães jovens, isoeritrólise neonatal, defeitos genéticos eritrocitários e reações de transfusão e, para cães mais velhos, anemia hemolítica imunomediada, reações de transfusão, intoxicação por cebola e outras drogas, dirofilariose, intoxicação por cobre ou zinco e neoplasia.

Com relação à hemólise imunomediada, deve-se diferenciar a babesiose da micoplasmose hemotrópica canina (BUNDZA et al., 1976).

Uma vez que a doença é transmitida por carrapatos e estes podem encontrar-se infectados com diferentes patógenos, coinfeções podem ocorrer e devem ser consideradas, visto, também, a inespecificidade dos sinais clínicos apresentados na babesiose, os quais são, em parte, comuns a outras hemoparasitoses (DE TOMMASI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014).

### **3.2 Hepatozoonose canina**

#### **3.2.1 Etiologia, Taxonomia e Histórico**

A hepatozoonose canina é uma parasitose transmitida por carrapatos e causada por protozoários intraleucocitários do gênero *Hepatozoon*. Atualmente, das 336 espécies conhecidas deste gênero (BANETH, 2011), duas podem infectar canídeos, sendo elas *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*, as quais distribuem-se por várias regiões do mundo (O'DWYER, 2011).

As espécies de *Hepatozoon* compreendem protozoários apicomplexas da classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Adeleorina, pertencentes à família Hepatozoidae (DEMONER et al., 2013).

O gênero foi descrito pela primeira vez na Índia, em 1905, por Bentley e James, através da análise de leucócitos de cães sendo, então, denominado *Leucocitozoon canis*. A partir da observação de parasitos em neutrófilos de ratos, os quais multiplicavam-se por merogonia no fígado destes hospedeiros, e realizavam esporogonia em ácaros, Miller, em 1908, identificou o gênero como *Hepatozoon*. Em 1910, Wenyon, reavaliando observações de Bentley e James, viabilizou a substituição do nome genérico *Leucocitozoon* por *Hepatozoon*, daí surgindo a espécie *Hepatozoon canis*.

Infecções por *H. canis* em algumas espécies de carnívoros domésticos e selvagens têm sido relatadas em vários países, a exemplo de coiotes e felídeos nos Estados Unidos, raposas vermelhas na Europa, além de leões e gatos domésticos na África, Índia e Israel (MERCER; CRAIG, 1988; BANETH et al., 1995; CRIADO-FORNELIO et al., 2007).

### 3.2.2 Ciclo Biológico e Transmissão

O ciclo biológico do parasito no carrapato inicia-se a partir da ingestão de leucócitos e monócitos contendo gametócitos, durante o repasto sanguíneo. Os gamontes são liberados no intestino do hospedeiro dando início à gametogênese. Inicia-se a singamia, originando o zigoto, que segue em direção à hemocele, onde ocorre a esporogonia formando-se o oocisto, o qual apresenta entre 30-50 esporocistos, contendo 7-14 esporozoítos e, quando ingerido pelo cão, dá continuidade ao ciclo (BANETH et al., 2007).

O ciclo biológico do *H. canis* (Figura 2) no cão inicia-se com a ingestão do carrapato que contenha oocistos maduros na hemocele do agente. Esta via permite a liberação dos esporozoítos no trato gastrointestinal do hospedeiro vertebrado. Estes penetram na parede intestinal, ganham a circulação e se estabelecem nos tecidos hemolinfáticos, tais como baço, medula óssea e linfonodos, além de fígado, pulmões, rins e intestinos, dando início à merogonia e à formação de merontes. Merozoítos, após sua liberação dos merontes, invadem neutrófilos, onde desenvolvem-se como gamontes, passando a circular no sangue periférico. Os gamontes (Figura 3) têm forma elipsoidal, são compridos e medem cerca de 11 µm x 4 µm. Foi observada merogonia a partir do 13º dia de infecção. No 26º dia já é possível detectar dois tipos de merontes maduros:

micromerontes, os quais contêm 20-30 micromerozoítos periféricos que invadem neutrófilos e monócitos e dão origem aos gamontes circulantes, e macromerontes, os quais contêm 2-4 macromerozoítos, responsáveis pela formação de merontes teciduais secundários, continuando o ciclo esquizogônico. Os esquizontes se estabelecem, preferencialmente, em órgãos parenquimatosos, podendo ser, raramente, encontrados na musculatura. No 28º dia, já podem ser observados gamontes no sangue periférico, completando o ciclo no hospedeiro intermediário. O pico de parasitemia ocorre no 39º pós infecção. Os gamontes são elipsoidais, encapsulados e localizam-se no citoplasma dos leucócitos (BANETH et al., 2007; BANETH, 2011).

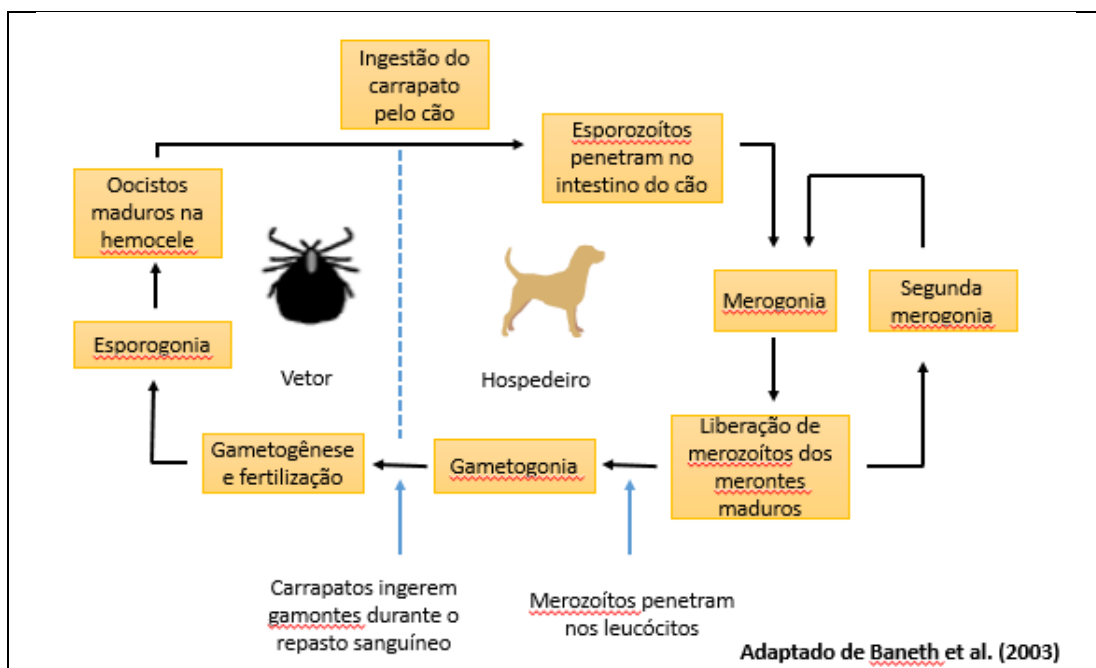


Figura 2 – Ciclo biológico do *Hepatozoon canis*. Adaptado de Baneth et al. (2003)



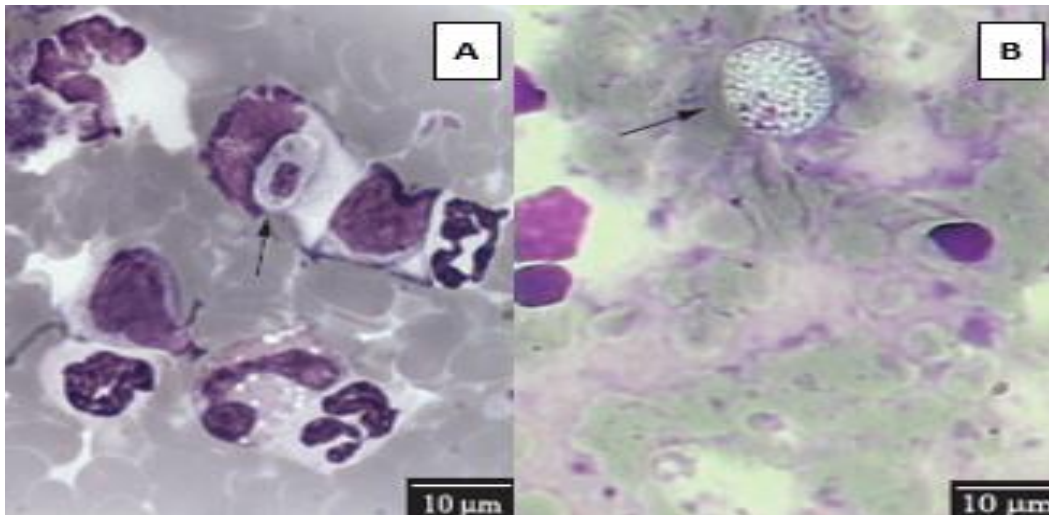


Figura 3 - A – Gamonte maduro de *H. canis*. B – Meronte em desenvolvimento. Adaptado de O'Dwyer (2011)

Ainda hoje, ocorrem divergências sobre os vetores de *H. canis*. Porém, o carrapato *R. sanguineus* é considerado o principal vetor biológico deste agente (BANETH; WEIGLER, 1997), possuindo alta susceptibilidade à infecção e capacidade vetorial, segundo diversos estudos em regiões fora do Brasil (BANETH et al., 2001; BANETH et al., 2007). Esta espécie de carrapato é a mais encontrada em cães de todas as regiões do Brasil, estabelecendo-se em áreas urbanas e rurais (DANTAS-TORRES, 2010). Nesta espécie de carrapato ocorre transmissão transtadial, ninfa para adulto, quando, então, será carregada a forma infectante do parasito (BANETH et al., 2001).

Contudo, a hepatozoonose foi associada a outros vetores, incluindo *Amblyomma* spp. (FORLANO et al, 2005; LABRUNA et al., 2000), *Haemaphysalis* spp, *Dermacentor* spp. e outros ixodídeos (MAKIMURA et al., 1991; MURATA et al, 1995). Além disso, suspeita-se que a transmissão possa ocorrer através do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MIRANDA et al., 2011). Um estudo desenvolvido por Hornok et al. (2013) detectou a infecção em *Dermacentor* spp., na Hungria. Neste trabalho, os cães tiveram acesso a ninhos de raposas comumente infestadas por esta espécie de carrapato.

No Rio de Janeiro, um estudo da prevalência do parasito em cães de áreas rurais do estado, identificou infecção em *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp., apontando o último como um possível vetor nas áreas rurais (FORLANO et al, 2005). Estudos experimentais de Rubini et al. (2009) demonstraram a infecção e a capacidade vetorial do carrapato a partir da infecção de cães negativos com carrapatos *Amblyomma ovale*

infectados por *H. canis* e a partir da infecção de carrapatos *R. sanguineus*, *A. ovale* e *Amblyomma cajanense* com *H. canis*.

A respeito da transmissão por *A. ovale*, salienta-se que, neste espécie, a esporogonia dá-se de maneira rápida, ocorrendo infecção e transmissão na fase adulta. Além disso, em cães de áreas rurais apenas são observados carrapatos adultos, em condições naturais (LABRUNA et al., 2005; RUBINI et al., 2009).

Além da possibilidade do envolvimento de diferentes espécies de carrapatos na transmissão de *H. canis*, há que se considerar que a mesma pode diferir entre isolados dos grupos *R. sanguineus* e *A. ovale*, uma vez a existência de variabilidade genotípica e fenotípica do agente, tal como foi relatado em estudo como o de Burlini et al. (2010). Tal variabilidade genética pode ser exemplificada pelos isolados *H. canis* – Curupira 1, *H. canis* – Curupira 2 e *H. canis* – Curupira 3, encontrados no Brasil (CRIADO-FORNELIO et al., 2007). Sabe-se que *H. canis* – Curupira 3 é o agente etiológico da hepatozoonose canina na América do Sul (RUBINI et al., 2005; CRIADO-FORNELIO et al., 2006), porém os carrapatos *R. sanguineus* do Brasil são resistentes à infecção experimental com este isolado. Além disso, estudos indicaram que *A. ovale* é um vetor de *H. canis* – Curupira 3 no Brasil (FORLANO et al., 2005). Entretanto, segundo Demoner et al. (2013), nas áreas rurais brasileiras, onde o patógeno é mais prevalente e há uma maior prevalência de *A. ovale* os cães podem ser infectados por diferentes espécies de carrapato, sendo necessários mais estudos sobre os possíveis vetores, isolados de *H. canis* ou comprovação de novas formas de transmissão.

No que diz respeito a outras formas de transmissão, além da transmissão horizontal por carrapatos, a transmissão vertical ou congênita foi relatada por Murata et al. (1993), em seis ninhadas. Neste estudo, 79,3% dos filhotes apresentaram gamontes e merontes nos tecidos a partir do 16º ao 60º dia de nascimento. Além disso, as cadelas estavam infectadas e os filhotes não tiveram contato com vetores, confirmando, desta maneira, esta forma de transmissão. Este tipo de transmissão não foi descrito para *H. americanum*.

A predação de hospedeiros paratênicos tem sido sugerida como via de transmissão, indicando um ciclo biológico alternativo com mais de um hospedeiro intermediário para *H. canis*. Este hospedeiro apresenta cistozoítos em seus tecidos

(SMITH, 1993). Formas císticas foram observadas em esquilos, serpentes, lagartos e anuros (DESSER, 1990; SMITH et al, 1994). Esta via foi reconhecida na transmissão de *H. americanum*, através dos estudos com roedores infectados com *Hepatozoon* spp. ou infestados com *Amblyomma maculatum*, vetor da hepatozoonose canina americana (JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2009). Hornok et al. (2013) avaliaram três grupos de cães e seus carrapatos, no sul da Hungria, e sugeriram a predação como uma via potencial de transmissão para os cães infectados naturalmente com *H. canis*, uma vez que, naquele país, a infecção fora descrita apenas numa região que é considerada não endêmica para *R. sanguineus*. Além disso, os cães infectados tiveram acesso a tocas de raposas vermelhas, abundantes em alguns município estudados, as quais são frequentadas por roedores. Neste estudo, não foi desconsiderada a infecção por outras espécies de carrapatos.

Uma vez que, no Brasil, a maioria dos relatos da infecção dá-se em áreas rurais e, que a dieta dos cães deste locais podem incluir presas, a predação, como via alternativa para transmissão, deve ser considerada (DEMONER et al., 2013).

### 3.2.3 Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais

A patogenicidade de *H. canis* ainda é discutida entre muitos pesquisadores. Normalmente, os cães infectados apresentam a forma subclínica da doença, a qual ocorre em 70-80% dos animais. Num estudo de Kelly et al (2013), no Caribe, todos os cães positivos apenas para *H. canis* eram aparentemente saudáveis e não apresentaram anormalidades laboratoriais. Porém, em determinadas regiões, a doença é altamente relevante, causando doença grave, tornando-se um dos principais problema de saúde para a população canina na África, Ásia e Sul da Europa (EL-DAKHLI et al., 2013). A forma aguda pode evoluir para o óbito, rapidamente, enquanto a forma crônica apresenta a maior variedade de sinais clínicos. Na doença aguda observa-se elevada parasitemia, quando, aproximadamente, 100% dos neutrófilos do sangue periférico encontram-se infectados (BANETH et al., 2003). Little et al. (2009) comenta que quadros graves da doença podem ser resultado de elevada parasitemia ou de coinfeções.

Os sinais são inespecíficos, porém a maioria dos quadros são assintomáticos. Os quadros assintomáticos associam-se a baixas taxas de parasitemia, apresentando 1-5%

de neutrófilos infectados. Nos quadros sintomáticos, perda de peso, anorexia, febre, palidez de mucosas, corrimento ocular e fraqueza nos membros posteriores são os sinais mais frequentes (BANETH et al., 1998). Diarréia, vômito, anormalidades na marcha, poliúria e polidipsia, hiperestesia muscular também podem ser observados (GONDIM et al., 1998; MUNDIM et al., 2002; ALLEN et al., 2008; LITTLE et al., 2009; SAKUMA et al., 2009b). Lesões neurológicas e osteoproliferativas são raramente descritas. Marchetti et al. (2009) relataram um caso onde o paciente apresentava tetraparesia e atrofia muscular difusa, além de sinais inespecíficos, osteomielite e meningoencefalomielite. No Brasil, na maioria dos estudos que relataram sinais clínicos observados em cães doentes, estes animais encontravam-se coinfectados (MUNDIM et al., 1992; ODWYER et al., 1997; MUNDIM et al., 2008a; SASANELLI et al., 2009), o que impossibilita a vinculação dos sinais clínicos, exclusivamente, à hepatozoonose.

As alterações hematológicas variam assim como os sinais clínicos. Observam-se, principalmente, anemia arregenerativa, trombocitopenia e leucocitose com neutrofilia em casos de elevada parasitema. Em animais com leucocitose e elevada parasitemia, o número de gamontes observados pode chegar a mais de 50.000/ $\mu$ L de sangue. As alterações bioquímicas comumente observadas são hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumento da fosfatase alcalina e creatinina quinase séricas (BANETH; WEIGLER, 1997; GONDIM et al., 1998; BANETH et al., 2003; MARCHETTI et al., 2009). Da mesma forma como ocorre com os sinais clínicos, as alterações hematológicas não podem ser consideradas como exclusivas da infecção por *H. canis* (O'DWYER, 2011).

Conforme afirmam alguns autores, quadros imunossupressores induzidos por coinfectões com outros patógenos, a exemplo de *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., *Leishmania* sp. e *Toxoplasma gondii*, ou por medicação quimioterápica podem agravar o quadro clínico dos animais infectados por *H. canis* (MUNDIM et al., 2002; ANDERSSON et al., 2013), uma vez que, segundo Baneth et al. (2003), podem influenciar a patogênese de novas infecções por *H. canis*, bem como reativar infecções pré-existentes. Gaunt et al. (2010) comentam que estas associações podem provocar alterações nos parâmetros patofisiológicos nos animais infectados.

Miyama et al. (2011) observaram neutropenia em um cão infectado por *H. canis*. O animal era negativo para *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp. Os autores atribuíram este achado à osteomielite diagnosticada através de biópsia da medula óssea. Este animal não tinha histórico de terapia medicamentosa ou exposição a toxinas, nem revelou achados condizentes com neoplasia. Neutropenia imunomediada foi desconsiderada, embora não tenha sido realizada sorologia para anticorpos anti-neutrófilos.

### 3.2.4 Epidemiologia

A infecção por *H. canis* foi relatada em quatro continentes (Quadro 3), estabelecendo-se tanto em regiões subtropicais e tropicais quanto em regiões temperadas (MENN et al., 2010; MIRANDA et al., 2014) e associando-se com a presença do vetor (BANETH, 2011; O'DWYER, 2011).

Na América do Norte, a espécie mais prevalente é o *H. americanum* (ALLEN et al., 2008). Na América Latina existem poucos estudos sobre a prevalência da infecção por *H. canis*, sendo que a prevalência mundial desta infecção varia entre dois a 100% de infecção. Tal variabilidade, segundo O'Dwyer (2011), depende do estado imunológico do animal, seu habitat, do número de animais avaliados e do método de diagnóstico utilizado para confirmar a infecção.

A variação da prevalência devido ao método diagnóstico utilizado pode ser exemplificada pelos estudos como o de Otranto et al. (2011), no qual foi comparada a sensibilidade da citologia e PCR. A citologia em sangue, medula óssea e capa de leucócitos detectou gamontes em 18,4%, 28,3% e 69,4% dos esfregaços, respectivamente. A PCR em pele, medula óssea, sangue e capa de leucócitos detectou o DNA do parasito em 50%, 83%, 85,7% e 87,7% das amostras, respectivamente. Evidentemente, a PCR mostrou-se mais sensível que a citologia. Outro exemplo é o do estudo de Menn, Lorentz e Naucke. (2010), no qual oito amostras foram positivas na PCR, mas não na citologia e outras 20 amostras positivas na citologia foram negativas pela PCR. Sasaki et al. (2008) não detectaram o agente em 400 esfregaços sanguíneos, sendo possível sua detecção em 20,3% das amostras, utilizando a PCR.

Quadro 3 – Prevalência mundial de cães infectados por *Hepatozoon canis*

Continentes	País	Método Diagnóstico	Número de animais	Número de infectados (%)	Referência
<b>América</b>	Argentina	Citologia	06	83,3	Eiras et al. (2007)
		PCR	06	100	
	Brasil	PCR	346	79,2	Miranda et. al. (2014)
	Colômbia	Citologia	04	100	Ardila et al. (2007)
	Costa Rica	PCR	146	7,5	Rojas et al. (2014)
	Estados Unidos	PCR	614	2,3	Li et al (2008)
	St. Kitts	PCR	372	3,5	Kelly et al. (2013)
	Venezuela	Citologia	134	13	Criado-Fornelio et al (2007)
PCR		134	44,7		
<b>África</b>	Nigéria	qPCR	181	41,4	Komani et al. (2013)
	Sudão	PCR	78	42,3	Oyamada et al. (2005)
<b>Ásia</b>	Israel	RIFI	29	51,7	Shkap et al. (1994)
	Índia	Citologia	525	2,3	Abd Rani et al. (2011)
		PCR	525	30	
	Japão	RIFI	430	4,2	Inokuma et al. (1999)
<b>Europa</b>	Alemanha	Citologia	4681	2,2	Menn et al. (2010)
	Croácia	PCR	924	11,8	Votja et al. (2009)

Neste estudo, os autores sugerem a utilização concomitante de vários métodos diagnósticos, a fim de se alcançar o diagnóstico definitivo.

No Brasil, embora poucos relatos de infecção por *H. canis* tenham sido feitos, a infecção foi relatada em diversos estados e sua prevalência varia entre 0,49 e 79,2%, como pode ser visto no Quadro 4.

Na região sul do Brasil, Lasta et al. (2009) relataram o caso de um cão infectado por *H. canis*, em Porto Alegre. Na região norte do país, Aragão et al. (2008) relataram a infecção em dois cães, no Amazonas.

Uma maior prevalência em cães oriundos de áreas rurais foi demonstrada no Brasil, em diversos estudos epidemiológicos (O'DWYER, 2011). Massard (1979), utilizando a citologia, demonstrou a diferença entre a prevalência em cães urbanos (4,4%) e de áreas rurais (31,58%). Em áreas rurais do Rio de Janeiro, O'Dwyer et al. (2001) detectaram, entre 250 cães, 39,2% de infectados. Rubini et al. (2008) detectaram 53,3% (80/150) de cães de áreas rurais infectados, em São Paulo. Neste estudo, apenas 11,3% foram positivos no esfregaço sanguíneo. Em Uberlândia, pesquisando o parasito em cães urbanos, Gomes et al. (2010) encontraram 7,6% de infecção, utilizando o método parasitológico direto.

Co-infecções com outros agentes são descritas em diversos trabalhos (O'DWYER et al., 2006; EIRAS et al., 2013; KELLY et al., 2013; BANETH et al., 2014; RENÉ-MARTELLET et al., 2015). Na Índia, Abd Rani et al. (2011) observaram, através da PCR, que entre os 101 cães com infecções múltiplas 50% estavam coinfectados com *H. canis* e *E. canis*.

Em relação aos fatores de risco, ainda há poucos estudos epidemiológicos no Brasil. Quanto à idade, a enfermidade é mais prevalente em cães jovens, com idades inferiores a um ano (GOMES et al., 2010). Em estudos como o de Kamani et al. (2013), verificou-se que a maioria das infecções simples ocorreram em cães com idades entre nove e 12 meses. Otranto et al. (2011), verificaram que 43,9% dos cães infectados eram jovens. No Brasil, Mundim et al. (2008a), num estudo com 115 cães, observaram que 33,9% dos cães infectados tinham idades inferiores a um ano. No entanto, El-Dakhly et al. (2013) observaram, no Japão, que a infecção se estabelecia em cães entre seis meses e 13 anos de idade.

Quadro 4 – Prevalência de cães infectados por <i>Hepatozoon canis</i> no Brasil.					
Região	Estado	Método Diagnóstico	Animais do estudo	Número de infectados (%)	Referência
Centro-Oeste	Distrito Federal	Citologia	187	6,9	Chiareli (2009)
		PCR	187	37,9	
	Goiás	Citologia	53	5,5	Mundim et al. (2008b)
	Mato Grosso do Sul	Citologia	167	2,4	Salgado (2006)
Nordeste	Pernambuco	PCR	205	0,49	Ramos et al. (2010)
Sudeste	Espírito Santo	PCR	92	58,7	Spolidorio et al. (2010)
	Rio de Janeiro	Citologia	250	39,2	O'Dwyer et al. (2001)
	São Paulo	Citologia	222	5,9	O'Dwyer et al. (2006)
	Minas Gerais	PCR	346	79,2	Miranda et al. (2014)



No estudo de Sasaki et al. (2008), a infecção foi observada em cães com idades entre cinco semanas e 11 anos. Salgado et al. (2006), no Brasil, relataram que a infecção ocorreu em cães entre poucos meses e nove anos de idade. Contudo, em estudos como os de Inokuma et al. (1999) e de Abd Rani et al. (2011) as variáveis idade e sexo não se associaram à infecção. Tal divergência de prevalência da infecção entre as faixas etárias avaliadas nos estudos indica que não há predileção do parasita por determinada faixa etária, como foi constatado por Gomes et al. (2010) e O'Dwyer (2011).

Quanto à variável sexo, Hornok et al. (2013) não observaram associação com a infecção, embora a maioria dos cães positivos na PCR fossem machos. O'Dwyer et al. (2006), observaram uma maior prevalência em machos, sendo oito, entre 13 cães, positivos a *H. canis*. Recentemente, Miranda et al. (2014) observaram que a infecção foi mais prevalente em cães machos, na zona rural (56,6%) e mais prevalente em fêmeas, na zona urbana (57,2%). Segundo estes autores, a alta prevalência em machos em áreas rurais é explicada por uma maior exposição aos vetores, uma vez que estes animais transitam entre propriedades com maior frequência que as fêmeas. Entretanto, O'Dwyer (2011) afirma que o *H. canis* não tem predileção por um sexo, podendo ocorrer igualmente entre machos e fêmeas.

No que se refere à associação com a presença do vetor, num estudo de Votja et al. (2009), na Croácia, a infecção foi mais prevalente em cães de regiões costeiras, especialmente ao norte e centro do Adriático, locais onde o *R. sanguineus* é endêmico. Nas regiões intracontinentais deste país prevalecem os carrapatos *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus*, os quais tem baixa associação com a doença.

Atualmente, a pesquisa de *H. canis* em seus potenciais vetores tem sido realizada em diversos estudos. Na Nigéria, Kamani et al. (2013), utilizando a PCR, identificou o DNA do agente no sangue de três cães e em alguns de seus carrapatos *R. sanguineus*, *R. turanicus* e *H. leachi*. No sul da Hungria, Hornok et al. (2013) detectaram o DNA do agente em 67,2% (37/55) das larvas e ninfas de *Dermacentor* spp.

No Brasil, Gonçalves et al. (2014), no Rio Grande do Norte, pesquisando o DNA do parasito em *R. sanguineus* retirados de dois cães que apresentavam sinais clínicos comuns à hemoparasitoses, observaram o agente em um dos quatro carrapatos

analisados oriundos do cão 1, o qual foi positivo *H. canis* na PCR, além de observarem o agente em dois dos três carrapatos coletados do cão 2, o qual também estava infectado.

### 3.2.5 Diagnóstico

Deve-se suspeitar de infecção por *H. canis* quando o paciente apresentar perda de peso, anorexia, febre, palidez de mucosas, corrimento ocular e fraqueza nos membros posteriores (BANETH et al., 1998), os quais são os sinais clínicos mais frequentes. Poliúria e polidipsia são frequentemente observados em infecções, no Brasil (O'DWYER et al., 2006). Diarréia, vômito, anormalidades na marcha, hiperestesia muscular e alterações neurológicas, embora raras, devem ser considerados na investigação da hepatozoonose (GONDIM et al., 1998; MUNDIM et al., 2002 ALLEN et al., 2008; LITTLE et al., 2009; MARCHETTI et al., 2009; SAKUMA et al., 2009b). Além disso, o conhecimento sobre as hemoparasitoses endêmicas locais, somado aos parâmetros clínicos observados, viabiliza efetivas diferenciações diagnósticas. Entretanto, uma vez a inespecificidade dos sinais clínicos, o diagnóstico requer a realização de exames laboratoriais.

As alterações hematológicas, anemia arregenerativa, leucocitose com neutrofilia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumento da fosfatase alcalina e creatinina quinase séricas também permitem a suspeita desta infecção (BANETH; WEIGLER, 1997; BANETH et al., 2003; GONDIM et al., 1998; MARCHETTI et al., 2009).

Em animais com baixa parasitemia, o diagnóstico parasitológico é possível através da aspiração da medula óssea (BANETH et al., 2007). A partir do 28º dia, os gamontes já podem ser observados no sangue periférico (BANETH et al., 2007). Entretanto, o método diagnóstico de rotina é o exame microscópico de esfregaços sanguíneos a fim de detectar gamontes em neutrófilos e monócitos. Os gamontes compridos, têm forma elipsoidal e medem cerca de 11 µm x 4 (BANETH et al., 2003). Otranto et al. (2011) sugeriram que o uso da capa de leucócitos, ao invés do sangue total garante uma maior sensibilidade ao teste, o qual é 3,8 vezes mais sensível que o método de rotina e 2,5 vezes mais sensível que a citologia de medula óssea.

Cães doentes podem apresentar infecção latente por longos períodos (BANETH; WEIGLER, 1997). De acordo com O'Dwyer (2011), ocorre variação nos níveis de parasitemia, esta detectável ou não, em cães infectados livres de carrapato e não expostos à reinfeção. Em alguns destes pacientes, os gamontes desaparecem da circulação, tornando-se indetectáveis pelos métodos parasitológico direto e molecular, o que gera questionamento quanto ao cão eliminar o agente ou persistir infectado com um nível de parasitemia extremamente baixo.

Mesmo com a praticidade do exame citológico do esfregaço, este não permite a diferenciação entre espécies. Outra desvantagem é a sua baixa sensibilidade em casos de parasitemia baixa ou intermitente (BANETH et al., 1998).

Histopatologia e *imprint* são utilizados no diagnóstico *post-mortem*. Merontes podem ser observados na medula óssea, baço, fígado, pulmões, coração, rins e linfonodos, onde macromerozoítos dispõem-se pela periferia do meronte maduro (BANETH et al., 2003; O'DWYER et al., 2004).

Testes sorológicos têm sido usados em casos de baixa parasitemia e infecções recentes, anteriores à formação de gamontes. Em estudos de soroprevalência a Imunofluorescência Indireta (RIFI) pode ser viável. No entanto, Shkap et al. (1994) utilizaram imunofluorescência para a detecção do agente em cães com alta parasitemia. Porém, neste estudo, a não detecção de anticorpos em um animal patente e num animal não patente infectado previamente levaram a questionamentos sobre a recomendação da técnica. Entretanto, em 1998, Baneth et al., utilizando este método detectaram anticorpos reativos ao agente, observando IgM entre o 16º e o 39º dia dias pós-infecção e IgG entre o 22º e o 43º dias pós-infecção. Inokuma et al. (1999), utilizaram a RIFI para detecção de anticorpos anti-*H.canis*, encontrando 4,2% de positividade entre 430 animais, contudo utilizaram a mesmo protocolo questionado por Shkap et al. (1994).

O método de ELISA detecta anticorpos contra antígenos solúveis totais do parasito, apresentando boa especificidade e sensibilidade. (GONEN et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2005).

No Brasil, a avaliação sorológica é raramente empregada, pois há necessidade de antígenos advindos de cães com elevada parasitemia, o que não é comum neste país.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo utilizada em inúmeros estudos, sendo considerada o método mais sensível e específico na detecção desta infecção (CRIADO-FORNELIO et al., 2007; INOKUMA et al., 2002; KELLY et al., 2013). O método tem sido utilizado na detecção do DNA do patógeno em sangue, capa de leucócitos, medula óssea (INOKUMA et al., 1999) e em carrapatos (GONÇALVES et al., 2014). Porém, a PCR apresenta certas limitações, como foi comentado no estudo de Lasta et al. (2009), os quais afirmaram que mesmo utilizando diferentes temperaturas de hibridização, bandas inespecíficas e formação de hibridizações *primer-dimer* podem ocorrer, pois um primer pode possuir alguns pares de base que são complementares a ele mesmo, na extremidade 3'. Outra limitação do método é que ele não permite a diferenciação entre espécies, exigindo a utilização de outra técnica molecular como o sequenciamento. Um outro ponto importante é a seleção do *primer* para o estudo, pois *primers* comuns e específicos podem resultar em variação na prevalência. Tal fato foi constatado no estudo de El-Dakhly et al. (2013), onde, utilizando-se um *primer* comum, detectou-se 42,9% de animais infectados por *H. canis* e, utilizando-se um primer específico, detectou-se 41,3% de cães infectados pelo mesmo agente etiológico. Além disso, a citologia acusou apenas 23,6% de infecção por *H. canis*.

Otranto et al. (2011), concluíram que a PCR realizada a partir de amostras de capa de leucócitos é a técnica mais sensível para a detecção de *H. canis* em cães, além de afirmar que, atualmente, não há um método padrão-ouro estabelecido.

Sugere-se complementar os resultados da PCR como sequenciamento, utilizado para a especificação dos isolados (ANDERSSON et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014).

### 3.2.6 Considerações sobre zoonose

Foi relatado um caso humano de infecção por *Hepatozoon* spp., segundo Lappin (2010). Porém, não foi esclarecida a via de transmissão, neste caso, sugerindo-se o cuidado na remoção de carrapatos e a ingestão de carnes cozidas.

#### **4. CAPÍTULO I**

### **BABESIOSE EM CÃES DE ITUBERÁ, MICRORREGIÃO DE VALENÇA, BAHIA, BRASIL**

## 4.1 Introdução

Ecorregiões da Mata Atlântica brasileira, como as Florestas Costeiras da Bahia, apresentam condições climáticas favoráveis à dispersão biogeográfica de hemoparasitos, bem como dos seus vetores e, conseqüentemente, ao estabelecimento de hemoparasitoses, como a babesiose canina, em diferentes localidades do sudeste baiano.

A Babesiose Canina é uma hemoparasitose transmitida por carrapatos causada por protozoários intraeritrocitários pertencentes ao gênero *Babesia* (MURASE et al. 1993; VIDOTTO; TRAPP, 2004), que acomete acomete canídeos domésticos e silvestres (BOOZER; MACINTIRE, 2003).

A infecção por *Babesia* spp. leva a quadros hemolíticos intravasculares e extravasculares, desencadeados pela ação mecânica dos parasitos e de anticorpos sobre eritrócitos parasitados (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; JACOBSON, 2006), pela ação de toxinas hemolíticas, bem como foi proposto atualmente (CARLI et al., 2009), levando à Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) e, conseqüentemente, anemia hemolítica imunomediada, culminando na Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), determinando maior gravidade da doença (MATIJATKO et al., 2010; SCHETTERS et al., 2009; WELZL, 2001).

No Brasil, os sinais clínicos mais frequentes nos cães incluem mucosas pálidas (GUIMARÃES et al., 2004), apatia, anorexia, febre, desidratação, perda de peso, dor abdominal e sensibilidade à palpação renal (BASTOS et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2002). Alterações hematológicas como anemia normocítica hipocrômica, policromasia, anisocitose, leucocitose por neutrofilia, monocitose, linfopenia (GUIMARÃES et al., 2004), leucopenia, pancitopenia (JOJIMA et a., 2008), anemia hemolítica regenerativa (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006) e trombocitopenia (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; JOJIMA et a., 2008; SANTOS et al., 2009) são frequentes.

A doença pode manifestar-se de forma hiperaguda, aguda, subclínica ou crônica (ABDULLAHI et al., 1990). Na forma subclínica, predominante nos cães brasileiros, os cães apresentam-se aparentemente normais ao exame físico, além de, comumente, serem negativos no exame parasitológico direto (MAIA, et al., 2007; VIDOTTO; TRAPP, 2004).

No Brasil, a doença é endêmica, com maior ocorrência em áreas urbanas (PASSOS et al., 2005), distribuindo-se na maioria das regiões (BASTOS et al., 2004; DANTAS-TORRES, 2008) com prevalência variável entre 0,97% (LEMOS et al., 2012) a 81,6 % (SOUSA et al., 2013), dependendo do local, população estudada e teste diagnóstico utilizado (TABOADA, 1998). *Babesia canis vogeli* é a principal espécie encontrada em cães brasileiros (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009; SILVA et al., 2012; SPOLIDORIO et al., 2011), havendo relatos de *Babesia gibsoni* no sul do país (TRAPP et al., 2006; JOJIMA et al., 2008).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, endêmico em centros urbanos brasileiros, é o principal vetor da doença (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001). Embora a babesiose seja prevalente nas áreas urbanas, relacionando-se com a presença do *R. sanguineus*, estudos têm mostrado o estabelecimento da doença em áreas rurais (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2014).

O Brasil, bem como a região nordeste e, mais especificamente, o estado da Bahia, carecem de dados epizootiológicos sobre a babesiose. Desta forma, uma vez que *Babesia* spp. foram identificadas, outrora, em cães de estados nordestinos como o Piauí e o Maranhão, e em carrapatos de cães do Maranhão e do Rio Grande do Norte, além de terem sido identificadas em cães oriundos das cidades de Ilhéus e Itabuna, na Bahia, o objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência do parasito em cães do sudeste baiano, bem como determinar os possíveis fatores de risco associados a esta infecção, além de identificar as manifestações clínicas e hematológicas associadas, contribuindo com mais dados epizootiológicos para a melhor compreensão do comportamento da babesiose no sudeste da Bahia.

## **4. 2 Material e Métodos**

### Local de estudo

Um estudo transversal foi realizado no município de Ituberá, situado na mesorregião sul baiana, microrregião de Valença (13°43' S, 39°08' W) (Figura 4). A localidade tem clima quente, temperatura média de 25,3° C e amplitude térmica anual de 5,6°C, pluviosidade anual variando entre 1. 800 a 2. 400 mm, distribuídos ao longo

do ano. O bioma do município é representado pela Mata Atlântica. O município tem uma população total aproximada de 26.591 habitantes, área total de 417,274 Km<sup>2</sup> e densidade de 63,73 habitantes/Km<sup>2</sup> (IBGE; 2013). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz, através do protocolo 028/2012.

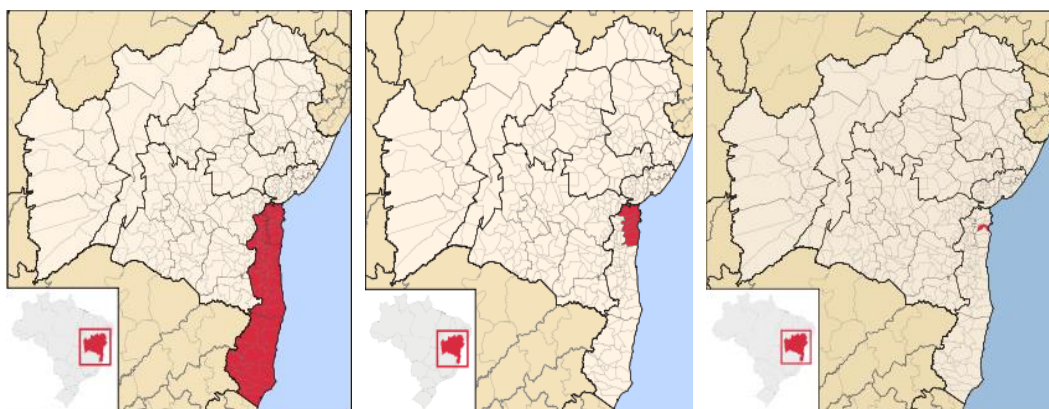


Figura 4 – Mesorregião do Sul da Bahia (a), Microrregião de Valença (b), Município de Ituberá (c), Estado da Bahia. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/>

#### Animais do estudo

Para o cálculo do tamanho amostral utilizou-se o software Epi Info 3.5.3, com intervalo de confiança de 95%, considerando-se o tamanho da população canina como sendo 10% da população humana do município (CIFUENTES, 1988). A frequência estimada de animais infectados foi estabelecida em 50%, com um erro de 5%. Fizeram parte do estudo 380 cães adultos com idade superior a um ano, incluídos a partir da autorização dos proprietários. A coleta de amostras foi realizada entre os meses de maio e setembro de 2012 e foi distribuída igualmente nos bairros da cidade, cobrindo áreas urbanas (326 cães) e rurais (54 cães). A proporção da população de cada distrito em relação ao total da população também foi determinada. Em cada domicílio visitado, foram avaliados, no máximo, dois cães.

#### Coleta de dados clínicos

Todos os animais foram inspecionados e avaliados quanto aos sinais clínicos relacionados à enfermidades, e quanto à presença de carrapatos. As informações foram anotadas em fichas individuais.



### Coleta de dados epidemiológicos

Um questionário estruturado foi aplicado aos proprietários, para coleta de dados epidemiológicos, a fim de se detectar fatores de risco para a infecção, tal como a presença de carrapatos, habitat urbano ou rural, contato com outros cães, idade e sexo. Os proprietários dos cães tinham mais que 18 anos de idade e estavam responsáveis pelo domicílio, no momento da visita.

### Coleta de amostras sanguíneas

Foram coletados 10 ml de sangue total, por punção da veia cefálica ou jugular, as quais foram divididas em tubos com e sem EDTA. As amostras foram, posteriormente, aliquotadas em microtubos livres de DNase/RNase, para análise hematológica e molecular. Após a hematologia, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos (Celm<sup>®</sup> LS – 3 Plus), sendo separado em papa de hemácias e plasma, identificadas e congeladas a -20°C. As amostras acondicionadas em tubos sem EDTA foram usadas para análise sorológica.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de sangue do pavilhão auricular para confecção de esfregaços de sangue capilar.

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Genética do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz.

### Análise hematológica

Os parâmetros hematológicos avaliados foram analisados utilizando-se o Contador Automático de Células Sanguíneas ABC Vet, HORIBA<sup>™</sup>. Foram considerados anêmicos animais com hematócrito abaixo de 37%, trombocitopênicos animais com contagem de plaquetas inferior a  $2 \times 10^5/\text{mL}$  e leucopênicos os animais com contagem global de leucócitos abaixo de  $7 \times 10^3/\text{mL}$ . A contagem específica de granulócitos e agranulócitos foi realizada manualmente, através da análise do esfregaço de sangue venoso, com coloração de Diff-Quick, sob microscopia óptica.

### Exame Parasitológico Direto

Os esfregaços foram corados com coloração de Diff-Quick e analisados em microscópio óptico (Zeiss<sup>®</sup> Primo Star), em objetiva de 100X (imersão).

### Detecção de anticorpos anti-*Babesia canis*

Anticorpos anti-*Babesia canis* foram detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta, utilizando-se lâminas contendo merozoítas de *Babesia*, soros controles com títulos previamente conhecidos e soro anti-cão conjugado com isotiocianato de fluoresceína (F-7887<sup>TM</sup>, Sigma-Chemical, EUA). A diluição inicial foi 1:40 (COSTA-JÚNIOR, et al., 2009) e as amostras positivas foram retestadas em diluições seqüenciais na base dois até a negatização. A leitura foi realizada em microscópio trinocular epifluorescente (Modelo B51, Olympus), em objetiva de 40 x. As amostras de soro com títulos iguais ou superiores a 1:40 foram consideradas positivas.

### Extração de DNA e PCR

Para a investigação de *Babesia* spp., o DNA foi extraído do sangue total, utilizando-se o kit Easy-DNA (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a amplificação do gene rRNA 18S de *Babesia* spp., foram utilizados os *primers* Bab7 (5'-GGC TAC CAC ATC TAA GGA AG-3') and Bab9 (3'-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA G-5'), descritos por Duarte et al. (2011), os quais amplificam um fragmento com 490 pares de base.

O mix do PCR foi preparado de acordo com Duarte et al. (2008), com modificações, para um volume final de 25 µL, sendo: 1× PCR tampão; 2.5 mM de cloreto de magnésio; 0.2 mM de dNTP; 0.4 µM de *primer* direto Bab7; 0.4 µM de *primer* reverso Bab9 e 1.5 U de Taq DNA polimerase. Foram utilizados 5 µL de amostra de DNA, uma vez que a quantificação indicou uma baixa concentração de DNA nas amostras. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler, programado para 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 59 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C, por 2 minutos, precedidos por desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguidos por extensão final em 72 °C por 7 minutos. O controle positivo do foi preparado a partir de um isolado de *Babesia canis* cedido pela Dra. Renata Santiago Alberto Carlos (UESC). Água ultrapura foi usada como controle negativo. Os *amplicons* (10 µL/amostra) foram visualizados através de um

transiluminador ultravioleta, em gel de agarose a 2% (Agarose LE, Analytical Grade) em 1x TAE buffer e fotodocumentados. Os géis foram corados com 0.1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de SYBER<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain.

#### Análise dos dados

A prevalência e o intervalo de confiança exato binomial 95% foram calculados para os resultados da citologia, sorologia e PCR utilizando-se Sourceforge<sup>®</sup> (<http://sampsiz.sourceforge.net/iface/index.html>).

Os dados foram compilados e analisados através do programa Epi Info<sup>™</sup> (versão 3.5.4). O Teste do Chi-quadrado ( $X^2$ ) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para determinar a associação dos fatores de risco com infecção por *Babesia*. A partir de um intervalo de confiança de 95%, foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p \leq 0.05$ . Realizou-se regressão logística ( $p < 0,2$ ) nas variáveis da análise univariada. O Teste t foi realizado para comparar as médias do hematócrito dos animais infectados e não infectados.

### 4.3 Resultados

#### Exame parasitológico direto

Dos 380 cães, a infecção por *Babesia* spp. foi detectada em apenas dois esfregaços sanguíneos (0,5%; 95% CI 0,06 – 1,88).

#### Detecção de anticorpos anti-*Babesia canis*

Anticorpos anti-*B.canis* foram observados em 140 dos 380 animais avaliados (36,8%; 95% CI 31,98 – 41,91), na diluição 1:40. Nas diluições subsequentes, 1:80 e 1:160, foram observados 30 cães positivos (7,9%; 95% CI 5,39 – 11,08) e 7 cães positivos (1,8%; 95% CI 33,76 – 43,78), respectivamente.

#### PCR

Na análise molecular dos 380 cães, 147 (38,7%; 95% CI 33,76 – 43-78) foram positivos à PCR (Fig. 5).

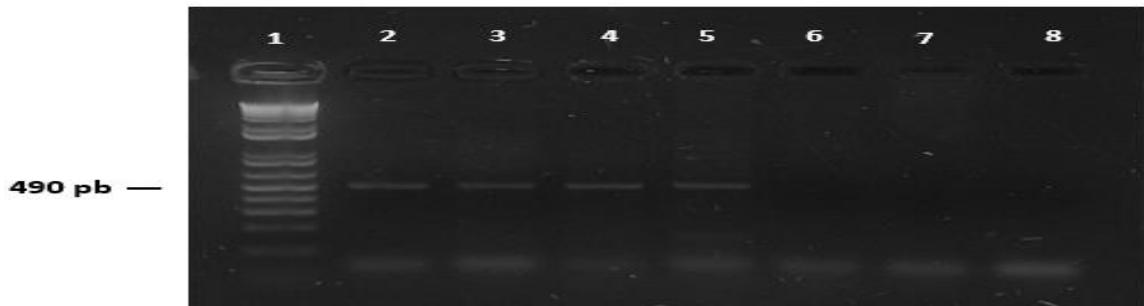


Figura 5 – Detecção de *Babesia* spp. pela PCR. Amplificação de uma região de 490 pb, referente ao gene 18S rRNA, realizada com os *primers* Bab7 e Bab 9. Linha 1: Marcador Molecular 1 kb Plus DNA Ladder. Linha 2: controle positivo. Linha 3 a 5: amostras sanguíneas positivas para *Babesia* spp. Linha 6 e 7: amostras negativas. Linha 8: controle negativo.

### Comparação entre os métodos diagnósticos

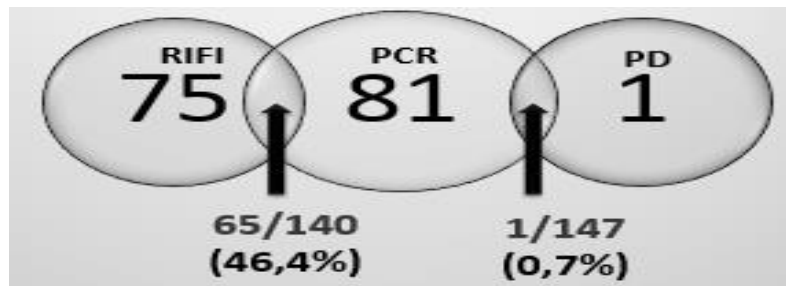


Figura 6 – Comparação de prevalência entre os métodos diagnósticos.

Na comparação entre os métodos, pode-se observar presença de infecção em 148 (66,3%) animais.

### Exame físico e Anamnese

Para realizar as análises dos dados do exame físico e hematologia, foram considerados os animais positivos nos três métodos diagnósticos utilizados, ou seja, um total de 223 cães (58,7%; 95% CI 53,55 – 63,68) infectados por *Babesia* spp.

À inspeção, 115 cães (30,2%) apresentaram carrapatos, estes, em sua maioria *Rhipicephalus sanguineus*. Destes, 67 cães (30,04%) foram positivos para *Babesia* spp. Dos 223 cães infectados por *Babesia* spp., em 38 (17,04%) não foram observados sinais clínicos ou alterações hematológicas, em 14 (6,3%) foram observados apenas sinais clínicos, em 105 (47,3%) foram observadas apenas alterações hematológicas e em 66 (29,7%) observaram-se sinais clínicos associados a uma ou mais alterações hematológicas. Dividindo-se a população de animais positivos num grupo de animais sintomáticos e num grupo de animais assintomáticos, observou-se que 80 cães (35,8%)

manifestaram sinais clínicos, associados ou não a alterações hematológicas, e que 143 (64,1%) cães eram assintomáticos. Dos 223 cães positivos pra *Babesia* spp. 16 (7,2%) estavam desidratados, 13 (5,8%) apresentaram diarreia, 19 (8,5%) apresentaram vômito e 53 (23,7%) apresentaram hipertrofia em linfonodos. No entanto, nenhum sinal clínico foi significativo para a infecção.

#### Análise hematológica

Dos 223 animais infectados, 171 (76,7%) apresentaram alterações hematológicas associadas, ou não, a sinais clínicos. Dentre estas alterações observou-se que 78 (34,9%) estavam anêmicos, 113 (50,6%) estavam trombocitopênicos, 60 (27%) apresentaram leucocitose e 12 (5,4%) apresentaram leucopenia. As médias dos hematócritos dos cães infectados (Ht = 40%) e não infectados (Ht = 39%) não diferiram significativamente (teste t = 1,33; g.l. = 222; p = 0,47). Nenhuma alteração hematológica encontrada foi significativa para a doença.

#### Fatores de risco

Dos 380 cães, 326 (85,8%) eram provenientes de área urbana e 54 (4,2%) de área rural, sendo 237 (62,4%) machos e 143 (37,6%) fêmeas. A distribuição etária mostrou 265 (69,7%) cães com idade entre 0-4 anos e 115 (30,3%) com idade superior a quatro anos. Na inspeção, foram encontrados carrapatos em 115 (30,2%) dos animais, com o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* presente na maior parte das infestações.

As variáveis sexo, local (urbano ou rural), exposição a outros cães e infestação por carrapato não constituíram fatores de risco tal como a idade, embora esta variável tenha mostrado que 154 cães com idades entre 0-4 anos (69%) estavam infectados. Uma vez que todos os 380 cães eram semidomiciliados, estabeleceu-se, a partir desta condição, a variável dorme em casa, a fim de se avaliar a possibilidade de uma maior exposição aos vetores tornar-se um fator de risco, nesta situação. Dos animais positivos, 173 (77,5%) não dormiam na residência, sendo considerado este um fator de risco para a doença (p = 0,02), como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 – Fatores de risco para a infecção por *Babesia* ssp. em cães no sudeste da Bahia, Brasil

Variáveis	Cães				Total	Valor P	OR	
	Positivos		Negativos					
		N	%	N				%
Infestação por carrapatos	Sim	67	30,3	48	30,2	115	0,87	1,00
	Não	154	69,7	111	69,8	265		
Local	Urbano	193	87,3	133	83,6	326	0,31	1,34
	Rural	28	12,7	26	16,4	54		
Sexo	F	84	38,0	59	37,1	143	0,65	0,96
	M	137	62,0	100	62,9	237		
Faixa Etária	0 – 4 anos	154	69,7	111	69,8	265	0,92	1,00
	> 4 anos	67	30,3	48	30,2	115		
Contato com outros cães	Sim	162	73,3	117	73,6	279	0,97	0,98
	Não	59	26,7	42	26,4	101		
Dorme em casa	Sim	48	21,7	51	32,1	99	0,02*	0,58
	Não	173	78,3	108	67,9	281		

N = número de animais, OR = Odds ratio, F = fêmea, M = macho, (\*) Diferença significativa  $p \leq 0,05$ .

#### 4.4 Discussão

A Babesiose canina, no Brasil, apresenta-se sob a forma subclínica, associando-se ao carrapato *R. sanguineus*, o qual ocorre com maior prevalência nos centros urbanos do país (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001; MAIA, et al., 2007; TRAPP; VIDOTTO, 2004).

Neste estudo, a baixa prevalência observada no esfregaço sanguíneo (0,5%) foi inferior as mais baixas prevalências encontradas no Brasil, como pode ser observado nos trabalhos de Braga (2011), Duarte et al. (2011) e Silva et al. (2012), onde observou-se a presença de merozoítos de *Babesia* em 2,2%, 3,9% e 3,3%, respectivamente, além da baixa parasitemia. Baixa prevalência de infecção associada à baixa parasitemia, como também foi observado neste trabalho, são características de infecções crônicas ou subclínicas (ALMOSNY et al., 2002).

A alta soroprevalência (36,8%), à RIFI observada neste local, também foi verificada, no Estado de Minas Gerais, onde 28,7% dos cães avaliados por Costa-Júnior

et al (2009) foram soropositivos para a doença. Percentuais mais altos do que os citados foram encontrados por Guimarães et al. (2009), que detectou soropositividade em 73,3% dos cães atendidos em nove clínicas veterinárias de Minas Gerais. Neste caso, os cães foram selecionados independentemente da queixa clínica. Taxas altas de soroprevalência também podem indicar cronicidade quando associadas à baixa parasitemia. Tal condição também pode ser indicada pela baixa variação da titulação observada (1:40-1:160), comumente encontrada após quatro a cinco meses após a infecção (VERCAMENN et al., 1997).

Neste estudo, 75/140 cães seropositivos para *Babesia* (53,6%) foram negativos na PCR, sugerindo que estes cães foram expostos, anteriormente, a este patógeno, mantendo níveis de anticorpos detectáveis ou que sejam portadores subclínicos ou crônicos da doença. Tal observação indica que o uso associado de técnicas sorológicas e moleculares pode ser útil na identificação de animais positivos, na forma subclínica ou crônica, a exemplo do que ocorreu neste estudo, no qual 65 (46,4%) cães foram positivos na RIFI e na PCR. Além disso, a alta positividade à PCR (38,7%) demonstra que este método foi uma ferramenta importante na detecção de infecções em 143/223 cães assintomáticos (64,1%), embora sua baixa sensibilidade, nesta condição (BOOZER; MACINTIRE, 2003).

A observação de 80 cães oligossintomáticos (35,8%) neste estudo sugere a presença da forma crônica da doença, nesta população, a qual é característica de áreas endêmicas (ALMOSNY et al., 2002). Considera-se, ainda, que a maioria dos animais portadores da forma subclínica podem apresentar-se aparentemente saudáveis, como foi observado na maioria dos nossos animais positivos (64,1%) (TABOADA, 1998). Segundo Vidotto e Trapp (2004), a forma subclínica da infecção é predominante no país. Adicionalmente, o quadro de latência da infecção, resulta num número reduzido de quadros hiperagudos e agudos como, também, foi observado, nos quais anemia, trombocitopenia e leucocitose são mais frequentes (TABOADA, 1998). Além disso, a igualdade entre as médias dos hematócritos dos cães portadores e não portadores da infecção sugere que os animais infectados, principalmente os cães aparentemente saudáveis, sejam portadores subclínicos ou crônicos, assintomáticos ou não, adaptados à doença, o que implica, significativamente, a manutenção da enfermidade. Além disso,

o fato que nenhum sinal clínico ou alteração hematológica ter sido significativo para a infecção pode demonstrar a baixa patogenicidade deste agente, para a população avaliada.

Apesar da manifestação das formas subclínica e crônica da doença nestes animais, a baixa patogenicidade observada em populações endêmicas e a possível adaptação dos cães ao agente, deve-se considerar que a exposição destes animais a condições estressantes, a qualquer tempo, pode resultar em manifestações clínicas da doença, o que pode levá-los, ou não, a sucumbir à infecção (IRWIN, 2009)

Em relação ao vetor, *Rhipicephalus sanguineus* foi a espécie de carrapato mais encontrada nas infestações, durante a inspeção dos animais. Embora este carrapato seja característico dos centros urbanos brasileiros, seu hábito nidícola (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001) permite uma condição ecológica favorável ao parasitismo em diversos ambientes, incluindo áreas urbanas e suburbanas, além de áreas rurais (SHIMADA et al., 2003, SILVA et al. 2012). No local de estudo haviam áreas urbanas e rurais, no entanto, durante as coletas, observou-se que bairros considerados urbanos, não possuíam tal característica, apresentando-se, caracteristicamente, rurais. Contudo, nossos cães foram classificados como urbanos e rurais de acordo com o estabelecido pelo município. Tal observação, indica o estabelecimento do *R. sanguineus* em áreas rurais do sudeste baiano, tal como foi observado em outras localidades do país (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; O'DWYER et al., 2009; SILVA et al., 2012).

A literatura atual demonstra a carência de dados epidemiológicos relacionados à babesiose, no país. Neste estudo, as variáveis sexo, infestação por carrapato, local, idade e exposição a outros cães não constituíram fatores de risco, indicando chances iguais de aquisição da infecção. Tal observação corrobora os dados encontrados em outros estudos realizados no Brasil (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009; MAIA et al., 2007; RIBEIRO et al.; 1990; SILVA et al. 2012; SILVA et al., 2014; TRAPP et al., 2006; UNGAR DE SÁ, et al., 2007). Neste estudo, não observamos associação da soropositividade com quaisquer das variáveis estudadas. Em relação à variável idade, houve discordância com estudos como o de Silva et al. (2012), os quais observaram que a idade inferior a 12 meses é um fator de risco para a doença. Já, Costa-Júnior et al. (2009), Dantas-Torres e Figueiredo (2006) e Trapp et al. (2006) afirmam



que a soroprevalência é maior em animais adultos. A divergência de informações, principalmente, quanto à variável idade aponta a necessidade de estudos mais detalhados para o esclarecimento sobre associação, ou não, desta variável com a infecção. Em nosso estudo, é provável que a não associação da idade com a infecção deva-se ao fato que a maioria dos animais apresentava idades entre 0-4 anos de idade, sendo que o estabelecimento desta faixa etária não permitiu a separação de animais jovens de animais velhos. Neste caso, salienta-se que as amostras, para este estudo, foram coletadas sem escolha prévia de idade. Por esta razão, o alto número de cães nesta faixa etária pode ter influenciado o resultado.

Todos os animais deste estudo possuíam baixo nível de restrição, portanto foram considerados animais semidomiciliados. A semidomiciliação associada à condição de dormir fora de casa, ou seja, do peridomicílio, como um fator de risco ( $p = 0,02$ ), deve-se, provavelmente, ao aumento da exposição destes animais aos vetores da babesiose canina, uma vez que os cães circulavam livremente por diferentes áreas do local, nas quais foi detectada a presença do carrapato *R. sanguineus*.

#### **4.5 Conclusões**

Em conclusão, a infecção por *Babesia* spp. está presente na população canina do sudeste da Bahia, manifestando-se, principalmente, sob a forma subclínica. Neste local, semidomiciliação associada à condição de dormir fora de casa é um fator de risco para a infecção. A associação de métodos diagnósticos, como o diagnóstico parasitológico direto, a RIFI e a PCR é importante para a identificação da infecção e para a determinação da prevalência em estudos epidemiológicos. Neste estudo, a PCR foi fundamental para a identificação da infecção em cães assintomáticos.

## **5. CAPÍTULO II**

### **HEPATOZOONOSE EM CÃES DE ITUBERÁ, MICRORREGIÃO DE VALENÇA, BAHIA, BRASIL**

## 5.1 Introdução

A hepatozoonose canina é uma hemoparasitose transmitida por carrapatos e causada pelos protozoários intraleucocitários, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*, os quais infectam canídeos quando ingeridos por estes hospedeiros (BANETH et al., 2003). No Brasil, a infecção por *H. canis* apresenta-se, principalmente, sob a forma subclínica, associada a baixa parasitemia (O'DWYER, 2011). No entanto, alterações clínicas e hematológicas tal como perda de peso, mucosa pálidas, hipertermia, anorexia, diarreia, alterações na marcha, poliúria, polidipsia, anemia, leucocitose com neutrofilia e trombocitopenia, foram relatadas (AGUIAR, et al., 2004; GONDIM et al., 1998; MARCHETTI et al., 2009; MUNDIM et al., 2008; PALUDO et al., 2003). A doença ocorre tanto em regiões subtropicais e tropicais quanto em regiões temperadas (MENN et al., 2010; MIRANDA et al., 2014) e associa-se com a presença do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*, principalmente (BANETH; WEIGLER, 1997). A prevalência mundial varia entre 2,3 a 100% de infecção (EIRAS et al., 2007; LI et al. 2008). No Brasil, a infecção foi relatada em diversos estados, acometendo, principalmente, cães de áreas rurais (MASSARD, 1979; O'DWYER et al., 2001; RUBINI et al., 2008; MIRANDA et al., 2014), com sua prevalência variando entre 0,49 e 79,2% (RAMOS et al., 2010; MIRANDA et al., 2014), dependendo do estado, do local de origem dos cães (urbano ou rural) e do método de diagnóstico utilizado (O'DWYER, 2011). Quanto aos fatores de risco, idade e sexo foram associados à infecção em alguns estudos (GOMES et al., 2010; MIRANDA et al., 2014), porém O'Dwyer (2011) afirma que o parasita não tem predileção por sexo e faixa etária.

O diagnóstico da infecção baseia-se na visualização de gametócitos em esfregaços sanguíneos ou de capas leucocitárias, em exames sorológicos e/ou em testes moleculares (MYLONAKIS et al., 2005; OTRANTO et al., 2011; KELLY et al, 2013). Apesar do uso de rotina do esfregaço sanguíneo como método diagnóstico, este deve ser associado a testes mais sensíveis, como os sorológicos e moleculares, em razão da redução da sua sensibilidade em casos de parasitemia baixa ou intermitente (BANETH et al., 1998).

O Brasil, bem como a região nordeste e, mais especificamente, o estado da Bahia, carecem de dados sobre a prevalência e epizootiologia da hepatozoonose canina, uma

vez que o *H. canis* ainda não foi relatado neste local. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência do parasito em cães do município de Ituberá, no sudeste baiano, bem como determinar os possíveis fatores de risco e as manifestações clínicas e hematológicas associadas a esta infecção.

## 5.2 Material e Métodos

### Local de estudo

Um estudo transversal foi realizado no município de Ituberá, situado na mesorregião sul baiana, microrregião de Valença (13°43' S, 39°08' W) (Figura 7). A localidade tem clima quente, temperatura média de 25,3° C e amplitude térmica anual de 5,6°C, pluviosidade anual variando entre 1. 800 a 2. 400 mm, distribuídos ao longo do ano. O bioma do município é representado pela Mata Atlântica. O município tem uma população total aproximada de 26.591 habitantes, área total de 417,274 Km<sup>2</sup> e densidade de 63,73 habitantes/Km<sup>2</sup> (IBGE; 2013). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz, através do protocolo 028/2012.

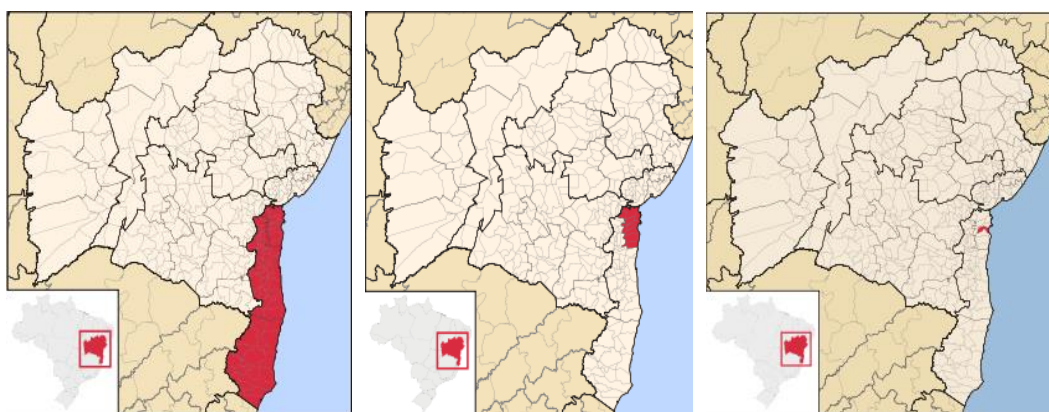


Figura 7 – Mesorregião do Sul da Bahia (a), Microrregião de Valença (b), Município de Ituberá (c), Estado da Bahia. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/>

### Animais do estudo

Para o cálculo do tamanho amostral utilizou-se o software Epi Info 3.5.3, com intervalo de confiança de 95%, considerando-se o tamanho da população canina como sendo 10% da população humana do município (CIFUENTES, 1988). A frequência estimada de animais infectados foi estabelecida em 50%, com um erro de 5%. Fizeram parte do estudo 380 cães adultos com idade superior a um ano, incluídos a partir da

autorização dos proprietários. A coleta de amostras foi realizada entre os meses de maio e setembro de 2012 e foi distribuída igualmente nos bairros da cidade, cobrindo áreas urbanas (326 cães) e rurais (54 cães). A proporção da população de cada distrito em relação ao total da população também foi determinada. Em cada domicílio visitado, foram avaliados, no máximo, dois cães.

#### Coleta de dados clínicos

Todos os animais foram inspecionados e avaliados quanto aos sinais clínicos relacionados às duas enfermidades, e quanto à presença de carrapatos. As informações foram anotadas em fichas individuais.

#### Coleta de dados epidemiológicos

Um questionário estruturado foi aplicado aos proprietários, para coleta de dados epidemiológicos, a fim de se detectar fatores de risco para a infecção, tal como a presença de carrapatos, habitat urbano ou rural, contato com outros cães, idade e sexo. Os proprietários dos cães tinham mais que 18 anos de idade e estavam responsáveis pelo domicílio, no momento da visita.

#### Coleta de amostras sanguíneas

Foram coletados 10 ml de sangue total, por punção da veia cefálica ou jugular, as quais foram divididas em tubos com e sem EDTA. As amostras foram, posteriormente, aliqüotadas em microtubos livres de DNase/RNase, para análise hematológica e molecular. Após a hematologia, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 minutos, na centrífuga Celm<sup>®</sup> LS – 3 Plus, sendo separadas as capas de leucócitos, as quais foram identificadas e congeladas a -20°C. Adicionalmente, foram coletadas amostras de sangue do pavilhão auricular para confecção de esfregaços de sangue capilar.

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Genética do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz.

#### Análise hematológica

Os parâmetros hematológicos avaliados foram analisados utilizando-se o Contador Automático de Células Sanguíneas ABC Vet, HORIBA™. Foram considerados anêmicos animais com hematócrito abaixo de 37%, trombocitopênicos animais com contagem de plaquetas inferior a  $2 \times 10^5/\text{mL}$  e leucopênicos os animais com contagem global de leucócitos abaixo de  $7 \times 10^3/\text{mL}$ . A contagem específica de granulócitos e agranulócitos foi realizada manualmente, através da análise do esfregaço de sangue venoso, com coloração de Diff-Quick, sob microscopia óptica.

#### Exame Parasitológico Direto

Os esfregaços foram corados com coloração de Diff-Quick e analisados em microscópio óptico (Zeiss® Primo Star), em objetiva de 100X (imersão).

#### Extração de DNA e PCR

Para a investigação de *H. canis*, o DNA foi extraído da capa de leucócitos, utilizando-se o kit Easy-DNA (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a amplificação do gene rRNA 18S de *Hepatozoon canis* foram utilizados os primers HEP144-169 (5'-GGTAATTCTAGAGCTAATA-3') e HEP743-718 (5'-ACAATAAAGTAAAAACA-3'), conforme Spolidorio et al. (2011), os quais amplificam um fragmento com 574-bp.

O mix do PCR foi preparado para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , sendo: 1 $\times$  PCR tampão; 3,5 mM de cloreto de magnésio; 0,2 mM de dNTP; 2,5U de Taq DNA polymerase e 0,4 mM de cada primer. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler, programado para 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, precedida por desnaturação inicial por 5 minutos em 95°C, seguida por extensão final de 5 minutos em 72 °C. O controle positivo foi preparado a partir de um isolado de *Hepatozoon canis* cedido pelo MSc Fernando Spagnol (Itamaraju-BA). Água ultrapura foi usada como controle negativo. Os amplicons (10  $\mu\text{L}$ /amostra) foram visualizados através de um transiluminador ultravioleta, em gel de agarose a 2% (Agarose LE, Analytical Grade)

em 1x TAE buffer e fotodocumentados. Os géis foram corados com 0.1 µg.mL<sup>-1</sup> de SYBER<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain.

#### Análise dos dados

A prevalência e o intervalo de confiança exato binomial 95% foram calculados para os resultados da citologia e PCR utilizando-se Sourceforge<sup>®</sup> (<http://sampsiz.e.sourceforge.net/iface/index.html>).

Os dados foram compilados e analisados através do programa Epi Info<sup>™</sup> (versão 3.5.4). O Teste do Chi-quadrado ( $X^2$ ) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para determinar a associação dos fatores de risco com a positividade para *H. canis*. A partir de um intervalo de confiança de 95%, foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p \leq 0.05$ . Realizou-se regressão logística ( $p < 0,2$ ) nas variáveis da análise univariada. Teste t foi realizado para comparar as médias do hematócrito dos animais infectados e não infectados.

### 5.3 Resultados

#### Exame Parasitológico Direto

Gamontes de *Hepatozoon canis* não foram visualizados nos esfregaços sanguíneos.

#### Análise Molecular

À PCR houve detecção de DNA de *H. canis* em 163/380 cães (42,9%; 95% CI 37,85 – 48,04).

#### Exame Físico e Anamnese

Para realizar as análises dos dados do exame físico e hematologia, considerou-se o resultado da PCR, ou seja, um total de 163 cães (42,9%; 95% CI 37,85 – 48,04) infectados por *H. canis*.

À inspeção, 115/380 cães (30,2%) estavam infestados por carrapatos, sendo a maioria *R. sanguineus*. Dos 163 cães infectados por *H. canis*, 48 (29,4%) estavam

infestados por carrapatos. Em 17 cães (10,4%) foram observados apenas sinais clínicos discretos, em 74 cães (45,4%) foram observadas apenas alterações hematológicas, 41 cães (25,2%) foram observados sinais clínicos discretos e alterações hematológicas, em 31 cães (19%) não foram observados sinais clínicos ou alterações hematológicas. Separando-se os cães infectados em grupos de cães sintomáticos e assintomáticos, 58 cães (35,6%) manifestaram sinais clínicos, associados ou não a alterações hematológicas e 105 cães (64,4%) eram assintomáticos. Dos cães positivos para *H. canis* 11 (6,7%) estavam desidratados, 31 (19%) apresentaram hipertrofia em linfonodos, 9 (5, 5%) apresentaram diarreia e 14 (8,6%) apresentaram vômito. Nenhum sinal clínico foi significativo para a infecção.

### Hematologia

Dos 163 animais positivos, 115 (70,5%) apresentaram alterações laboratoriais associadas, ou não, a sinais clínicos. Entre estas alterações observou-se que 76 (46,6%) estavam trombocitopênicos, 47 (28,8%) estavam anêmicos, 40 (24,5%) apresentaram leucocitose e 10 (6,1%) apresentaram leucopenia. As médias do hematócrito dos cães infectados (Ht= 41%) e não infectados (Ht = 39%) diferiram significativamente ( $p=0,01$ ), porém nenhuma outra alteração hematológica foi significativa para a infecção.

### Fatores de Risco

Dos 380 cães, 326 (85,8%) eram provenientes de área urbana e 54 (4,2%) de área rural, sendo 237 (62,4%) machos e 143 (37,6%) fêmeas. A distribuição etária mostrou 265 (69,7%) cães com idade entre 0-4 anos e 115 (30,3%) com idade superior a quatro anos. Na inspeção, foram encontrados carrapatos em 115 (30,3%) dos animais, com o carrapato *R. sanguineus* presente na maior parte das infestações.

As variáveis sexo, raça, idade, local, contato com outros cães, infestação por carrapato e semidomiciliação – dorme fora de casa não constituíram fatores de risco (Tabela 2). Salienta-se que todos os 380 cães estudados eram semidomiciliados. Esta condição, associada ao fato do animal dormir fora de casa foi associada à infecção, embora 113 cães infectados (69,3%) dormissem fora de casa, ou seja, do peridomicílio.



Tabela 2 – Fatores de risco para a infecção por *Hepatozoon canis* em cães no sudeste da Bahia, Brasil.

Variável	Cães Positivos <i>H. canis</i>		Cães Negativos <i>H. canis</i>		Total	Valor P	OR	
	N	%	N	%				
Infestação por carrapatos	Sim	48	29,4	67	30,9	115	0,81	0,93
	Não	115	70,6	150	69,1	265		
Local	Urbano	144	88,3	182	83,9	326	0,25	1,45
	Rural	19	11,7	35	16,1	54		
Sexo	F	60	36,8	83	38,2	143	0,61	1,06
	M	103	63,2	134	61,8	237		
Faixa Etária	0 – 4 anos	113	69,3	152	70	265	0,96	1,03
	> 4 anos	50	30,7	65	30	115		
Contato com outros cães	Sim	117	71,8	162	74,7	279	0,74	0,86
Dorme em casa	Não	46	28,2	55	25,3	101		
	Sim	50	30,7	49	22,6	99	0,07	1,51
	Não	113	69,3	168	77,4	281		

N = número de animais, OR = Odds ratio, F = fêmea, M = macho.

## 5.4 Discussão

No Brasil, a hepatozoonose apresenta-se sob a forma subclínica, associando-se ao carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e ocorrendo, principalmente, em áreas rurais (O'DWYER, 2011). O município de Ituberá situa-se nas Florestas Costeiras da Bahia, uma ecorregião da Mata Atlântica, onde as condições climáticas favorecem a dispersão biogeográfica de hemoparasitos, bem como dos seus vetores e, conseqüentemente, o estabelecimento de hemoparasitoses, como a hepatozoonose canina, em diferentes localidades.

Quanto ao exame parasitológico direto, assim como Sasaki et al. (2008) não detectaram o *H. canis* em 400 esfregaços sanguíneos, em nosso estudo, a detecção de gamontes nos 380 esfregaços sanguíneos analisados, também, não foi possível. Otranto et al. (2011) sugeriram que o uso da capa de leucócitos, ao invés do sangue total garante uma maior sensibilidade ao teste, o qual é 3,8 vezes mais sensível que o método de rotina e 2,5 vezes mais sensível que a citologia de medula óssea. Portanto, a detecção do parasito pode ter sido prejudicada pelo uso de um tecido menos sensível à infecção.

Deve-se considerar, também, a possibilidade da ocorrência de baixa parasitemia nos cães deste local. No entanto, O'Dwyer et al. (2001), encontraram gamontes em 39,2% dos esfregaços sanguíneos de 250 cães com baixos níveis de parasitemia, no Rio de Janeiro.

Entretanto, observamos uma alta prevalência da infecção por *H. canis*, à PCR (42,9%), corroborando estudos de Chiareli (2009), que encontrou 37,9% de infecção entre 187 cães, e de Spolidorio et al. (2010), que encontraram 58,7% positivos dos 92 cães avaliados. De acordo com Miyama et al. (2005), a positividade à PCR demonstra a presença da infecção. A alta prevalência observada através deste método, associada à ausência de gamontes nos esfregaços analisados sugere o estabelecimento de infecções crônicas e subclínicas na população canina de Ituberá. Além disso, considerando os achados clínicos e hematológicos, os quais sugerem que os animais desta população, em sua maioria, manifestam quadro subclínico, pode-se dizer que, neste caso, a PCR, mostrou-se suficientemente sensível para detectar a presença de *H. canis* em cães assintomáticos, subclínicos e crônicos, com baixa parasitemia. Diferentemente, do que foi sugerido por Boozer e Macintire (2003), a respeito da forma clínica, e Irwin (2009), a respeito da parasitemia. Neste estudo, o nível de parasitemia, embora indetectável, ainda foi suficiente para permitir a detecção da infecção no sangue dos hospedeiros.

Neste estudo, a maioria dos animais positivos apresentaram-se assintomáticos (64,4%), conforme observado por O'Dwyer (2011) nos cães brasileiros, o que sugere um perfil subclínico da doença, nesta população, o qual é comum em regiões endêmicas (ALMOSNY et al., 2002). Além disso, o fato que nenhum sinal clínico ou alteração hematológica ter sido significativo para a infecção pode demonstrar a baixa patogenicidade deste agente, para a população avaliada. Dos sinais clínicos observados, a hiperplasia de linfonodos foi a mais frequente. Porém, esta alteração não é comumente relatada, nesta infecção. O'Dwyer (2011) considera que tanto as alterações clínicas, quanto as laboratoriais, não devem ser atribuídas, exclusivamente, à hepatozoonose, uma vez que infecções por múltiplos patógenos são frequentes o país.

Além deste achado, 115 cães (70,5%) apresentaram alterações hematológicas como anemia, leucocitose com neutrofilia, leucopenia e trombocitopenia. Destas alterações, a trombocitopenia foi a mais frequente (46,6%), diferentemente do que é

observado no país e do que foi relatado nos trabalhos de Gondim et al. (1998) e de Mundim et al. (2008). O'Dwyer et al. (2006) e Lasta et al. (2009) não encontraram alterações hematológicas nos cães avaliados em Botucatu e Porto Alegre, respectivamente. Ainda, no que se refere a trombocitopenia, coinfeção com *Ehrlichia canis* não deve ser descartada, uma vez que esta alteração é característica da ehrlichiose canina e este agente não foi investigado em nosso estudo. Considerando o hematócrito dos animais infectados e não infectados, o fato das médias diferirem significativamente pode dever-se à coinfeção com outros hemoparasitas, uma vez que, no Brasil, coinfeções têm sido, comumente, relatadas com outros agentes etiológicos como *Babesia* spp. e *Ehrlichia canis*, (O'DWYER, 2011), os quais são transmitidos pela mesma espécie de carrapato encontrado na maioria da população estudada.

Apesar do perfil subclínico da doença nesta população de cães, da baixa patogenicidade observada em populações endêmicas e da possível adaptação dos cães ao agente, deve-se considerar que a exposição destes animais a condições estressantes, a qualquer tempo, pode resultar em manifestações clínicas da doença, o que pode levá-los, ou não, a sucumbir à infecção (IRWIN, 2009).

A alta prevalência da infecção pode estar relacionada ao perfil rural do município, da mesma maneira como foi observado em estudos que avaliaram cães de comunidades rurais brasileiras, onde observaram altas prevalências de infecção por *H. canis* (MASSARD, 1979; O'DWYER et al., 2001; RUBINI et al., 2008; MIRANDA et al., 2014).

Em relação ao vetor, o carrapato *R. sanguineus* foi observado em todas as infestações observadas neste estudo. Esta espécie é considerada o principal vetor biológico do *H. canis* (BANETH; WEIGLER, 1997), possuindo alta susceptibilidade à infecção e capacidade vetorial, segundo diversos estudos (BANETH et al., 2007; BANETH et al., 2001). No entanto, estudos, no Brasil, demonstraram o envolvimento de *Amblyomma* spp. na transmissão de *H. canis*, o indicando como um possível vetor nas áreas rurais (FORLANO et al, 2005; RUBINI et al., 2009). Desta maneira, embora a maior ocorrência de infestações por *R. sanguineus* nos cães destes estudo, não se pode descartar a possibilidade da presença de *Amblyomma* spp. neste local, uma vez que este vetor é comumente encontrado em áreas rurais (DEMONER et al., 2013), tal como

apresenta-se, caracteristicamente, o município de Ituberá. O local de estudo possuía áreas urbanas e rurais, no entanto, durante as coletas, observou-se que bairros considerados urbanos, não possuíam tal característica, apresentando-se, caracteristicamente, rurais. Contudo, nossos cães foram classificados como oriundos de áreas urbanas e rurais de acordo com o estabelecido pelo município. Tal observação, indica o estabelecimento do *R. sanguineus* em áreas rurais do sudeste baiano, tal como foi observado em outras localidades do país (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; O'DWYER et al., 2009; SILVA et al., 2012). Uma vez que todos os cães avaliados eram semidomiciliados, não se deve desconsiderar a infecção por outras espécies de carrapato, bem como por outras vias de transmissão, a exemplo da predação, uma vez que estes animais podem transitar livremente pelas matas, onde ficam expostos a outros hospedeiros domésticos e selvagens (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001; BANETH et al., 2007).

Quanto aos fatores de risco, ainda há poucos estudos que esclareçam a epidemiologia do parasito, no Brasil. Neste trabalho, as variáveis sexo, idade, raça, infestação por carrapato, local, contato com outros cães e semidomiciliação – dorme fora de casa não constituíram fatores de risco, indicando chances iguais de aquisição da infecção. Foi observada uma prevalência maior da infecção em cães com idades inferiores a um ano (GOMES et al., 2010), no entanto, em alguns estudos a infecção foi observada em cães com meses de idade até idades superiores aos 10 anos (GONDIM et al., 1998).

Quanto à variável sexo, recentemente, Miranda et al. (2014), observaram que a infecção foi mais prevalente em cães machos, na zona rural (56,6%) e mais prevalente em fêmeas, na zona urbana (57,2%). Segundo estes autores, alta prevalência em machos em áreas rurais é explicada por uma maior exposição aos vetores, uma vez que estes animais transitam entre propriedades com maior frequência que as fêmeas, o que pode ocorrer, no caso dos cães avaliados neste trabalho, uma vez que, neste estudo, a infecção foi mais observada em machos (63,2%).

Conforme O'Dwyer (2011), embora alguns estudos tenham identificado associação entre o sexo (MIRANDA et al., 2014) e a idade (GOMES et al. 2010) a infecção por *H. canis* não faz discriminação entre machos, fêmeas e faixas etárias.

## 5.5 Conclusões

Em conclusão, a infecção por *Hepatozoon canis* está presente na população canina do sudeste da Bahia, manifestando-se, principalmente, na forma subclínica. A elevada prevalência observada à PCR, a baixa parasitemia, o elevado número de cães assintomáticos e a ausência de fatores de risco associados indicam a baixa patogenicidade deste patógeno, nesta população. A PCR é um método de diagnóstico fundamental para a identificação e determinação da prevalência da infecção em animais assintomáticos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hemoparasitoses como a Babesiose e a Hepatozoonose caninas, na maioria dos casos, não levam os pacientes a condições clínicas graves, no Brasil, o que, provavelmente, deve-se ao perfil subclínico de ambas as doenças no país. No entanto, a identificação de seus agentes etiológicos torna-se importante em razão da sua influência na patogenia de infecções coinfectantes, e da necessidade de uma melhor compreensão epidemiológica destas doenças.

No que diz respeito ao diagnóstico dessas infecções, embora a praticidade do exame parasitológico direto, sabe-se que, na maioria das vezes, os diagnósticos citológicos são inconclusivos em razão de vários fatores como a falta de experiência na identificação de hemoparasitos, a confecção errônea dos esfregaços e fixação e coloração inadequadas. Além disso, níveis baixos de parasitemia, podem reduzir a sensibilidade do método, gerando resultados falso-negativos. Desta maneira, a associação de distintos métodos de diagnóstico é de fundamental importância para a detecção destas doenças.

Na região Nordeste do país, cães convivem continuamente com os carrapatos vetores, os quais têm seu ciclo biológico favorecido pelas tropicalidade climática, principalmente nas ecorregiões da Mata Atlântica. Desta maneira, a dispersão destes vetores e a manutenção destas doenças é facilitada. Sendo assim, o controle de carrapatos e a domiciliação dos animais tornam-se fundamentais para o controle da doença, nesta região.

Em razão da divergência entre estudos que avaliaram fatores de risco, bem como avaliaram manifestações clínicas e alterações hematológicas nessas doenças, sugere-se a realização de mais estudos que permitam uma avaliação mais detalhada da associação destas infecções com seus possíveis fatores de risco e manifestações clínicas e hematológicas. Além disso, investigação dos isolados de *H. canis* presentes no Brasil e sua relação com a hepatozoonose, bem com investigações que elucidem questões que ainda perduram sobre os possíveis vetores e vias de transmissão da doença, também são recomendados.

## REFERÊNCIAS

- ABD RANI, P. A. M. et al. A survey of canine tick-borne diseases in India. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 141, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-141>.
- ABDULLAHI, S. U. et al. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 145-147, 1990. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.1990.tb00750.x>
- ABDULLAHI, S.U.; SANNUSI, A. Babesiose canina. In: KIRK, R.W. **Atualização Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Manole, 1998. p. 1386-1388.
- ADAMU, M. et al. Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 119, 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-119>
- ADACHI, K. et al. Immunologic characteristics of anti-erythrocyte membrane antibody produced in dogs during *Babesia gibsoni* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.57, p.121–123, 1995.
- AGUIAR, D. M. et al. Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 411-413, 2004.
- ALBUQUERQUE, G. R. et al. Pesquisa de *Babesia* spp em cães dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15, SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA SEMINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2, 2008, Curitiba. **Resumos...**Curitiba, 2008. p. 397
- ALLEN, K. E. et al. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3-4, p. 220-225, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.027>.
- ALMOSNY, N.R.P. et al. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F.Livros, 2002, p. 135.
- ANDERSSON, M. et al. First evidence of *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog from Romania – A case report. **Tick and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 317-319, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.006>.
- ARAGÃO, S. K. S. et al. Ocorrência de *Hepatozoon canis* em canino (relato de dois casos). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008, Gramado. **Resumos...**SMURS:Porto Alegre, 2008. 684-1.

ARDILA, A. M. et al. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2007.

BANETH, G. et al. *Hepatozoon* sp. parasitemia in a domestic cat. **Feline Practice**, v. 23, n. 2, p. 10-12, 1995.

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 6, p. 365-370, 1997. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00482.x>.

BANETH, G. et al. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 299-305, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00160-x](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00160-x).

BANETH, G. et al. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 606-611, 2001. . [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0606:TOHCTD\]2.0](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0606:TOHCTD]2.0).

BANETH, G. et al. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 27-31, 2003.

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p 283-299, 2007. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-494R.1>.

BANETH, G. Perspective on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 3-11, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.015>.

BANETH, G. et al. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. **Veterinary Parasitology**, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.013>. *in press*

BASTOS, C. V. et al. Retrospective study (1998–2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1026, p.158–160, 2004.

BEAUFILS, J. P. et al. Hépatozoonose chez le chien et chez le renard: épidémiologie, clinique et traitement. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 31, n. 3, p. 243-253, 1996.



BECK, R. et al. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 7, p. 843-848, 2009.

BIRKENHEUER, A.J. et al. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (200-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 942-947, 2005.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00039-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00039-1)

BOURDEAU, P; GUELFY, JF. Canine babesiosis due to *Babesia canis*. **Le Point Veterinaire**, v. 27, n. 168, p. 103-116, 1995.

BRAGA, J. F. V. **Babesiose canina em Teresina, Piauí**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

BRANDÃO, L.P.; HAGIWARA, M.K. Babesiose canina:revisão. **Clínica Veterinária**, ano 7, v. 41,2002. p. 50-59.

BREITSCHWERDT, E.B. Babesiosis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders co, 1990.p.796-803.

BROWN, G. K. et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 9, 2006.

BUNDZA, A. et al. Haemobartonellosis in a dog in association with Coombs' positive anemia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 17, p. 267-270, 1976.

BURLINI, L. et al. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, v. 20, p. 361-74, 2010.

CAMACHO, A. T. et al. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia* microti-like agent. **Veterinary Record**, v. 149, n 18, p. 552-5, 2001.

CAMACHO, A. T. et al. Serum Protein Response and renal Failure in Canine *Babesia annae* Infection. **Veterinary Research**, v. 36, n 5-6, p. 713-722, 2005.  
[http://dx.doi.org/10.1051/vetres:20050265616\(03\)00039-1](http://dx.doi.org/10.1051/vetres:20050265616(03)00039-1)

CARLI, E. et al. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infection. **Veterinary**

**Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 51-57, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.002>

CARLOS, R.S.A. et al. Prevalência de *Babesia canis* em cães nos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006. Ribeirão Preto. **Anais...CBPV:Jaboticabal**, 2006. p. 335.

CARRET, C. et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CHAUVIN, A. et al. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v.40, p.37, 2009. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2009020>.

CHIARELI, R. A. **Investigação clínico-laboratorial e molecular da infecção por *Hepatozoon canis* em cães da região periurbana de Brasília**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

CIFUENTES, E. E. Program for the elimination of urban rabies in Latin America. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. 689-692, 1988.

COSTA-JÚNIOR, L.M. et al. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 257–260, 2009. doi:10.1016/j.rvsc.2008.07.002.

CRIADO-FORNELIO, A. et al. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 189-201, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00078-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00078-5)

CRIADO-FORNÉLIO, A. et al. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **International Journal for Parasitology**. v. 92, n. 1, p. 93–99, 2006. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-464R-1>

CRIADO-FORNELIO, A. et al. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 261-269, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vet.par.2006.09.042>.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p.197-203, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vet.par.2006.07.030>.

- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites and Vectors**, v. 3, p. 26, 2010. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>.
- DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brasil. **Parasites and Vectors**, v. 1, p. 25, 2008. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>.
- DE TOMMASI, A. S. et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 97, 2013. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-97>.
- DEMONER, L. C. et al. Hepatozoonose canina no Brasil: aspectos da biologia e transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, p. 193-202, 2013.
- DESSER, S. S. Tissue “cysts” of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus carolinensis*: the significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 257-259, 1990.
- DUARTE, S. C. et al. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 16-20, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.001>.
- DUARTE, S. C. et al. Phylogenetic characterization of *Babesia canis vogeli* in dogs in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 274-280, 2011.
- EIRAS, D. F. et al. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 275-279, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.010>.
- EIRAS, D. F. et al. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 163-173, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.11.008>
- EL-DAKHLI, K. M. et al. Prevalence and diversity of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs in Japanese islands and penínsulas. **Parasitology Research**, v. 112, p. 3267-3274, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3505-1>.
- ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, v.1, 573p, 1992.

FIGHERA, R.A. et al. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009).

**Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 974-987, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100012>

FOLDVARI, G. et al. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Veterinary Parasitology**, 127, n. 3-4, p. 221-226, 2005.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.016>

FORLANO, M. et al. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 1-7, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.066>

FRITZ, D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). **Parasitology Research**, v. 106, n. 6, p. 1339-1342, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1804-3>

FUKUMOTO, S. et al. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dog. **Journal of Veterinary of Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 977-981, 2001. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.63.977>

FURLANELLO, T. et al. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary Parasitologi**, v.134, p.77-85, 2005.

GAUNT, S. D. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites and Vectors**, v. 3, p. 33, 2010. [http:// dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-33](http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-33)

GOMES, P. V. et al. Ocurrence of *Hepatozoon sp* in dogs in the urban área originating from a municipality in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 155-161, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.07.020>

GONÇALVES, L. R. et al. Study on coinfection vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014071>.

GONDIM, L. F. et al. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01120-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01120-X).

GONEN, L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay antibodies to *Hepatozoon canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 131-139, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.021>.

GOO, Y. et al. *Babesia gibsoni*: identification, expression, localization, and serological characterization of a *Babesia gibsoni* 22-kDa protein. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 273–276, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.017>

GUIMARÃES, A.M. et al. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clínica Veterinária**. 41, 60–68, 2002.

GUIMARÃES, J.C. et al. Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 229, 2004.

GUIMARÃES, A. M. et al. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 49-53, 2009. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.018e1009>

HOLM, L. P. et al. Fatal babesiosis in an untravelled British dog. **Veterinary Record**, v. 159, p.179–80, 2006.

HORNOK, S. et al. High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 189-193, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.009>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [on line]. Censo Demográfico 2010. [cited jul 13]. Available from: <http://cod.ibge.gov.br/W1P>

INOKUMA, H. et al. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 10, p. 1153-1155, 1999. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.61.1153>.

INOKUMA, H. et al. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 265-271, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00065-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00065-1).

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasite and Vectors**, v. 2, supl. 1, p. 1-4, 2009. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p. 1141-1156, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.08.001>

JACOBSON, L. S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p.126-139, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.047>

JEFFERIES, R. et al. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 409–412, 2003. [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0409:TSOCBI\]2.0.CO.2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0409:TSOCBI]2.0.CO.2).

JEFFERIES, R. et al. *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. **Experimental Parasitology**, v.117, n. 2, p. 115-123, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.03.016>.

JOHNSON, E. M. et al. Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1-2, p. 27-32, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.050>.

JOHNSON, E. M. A. et al. Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1315-1318, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0375.x>.

JOJIMA, F. S. et al. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17, supl. 1, p. 277-283, 2008.

KAMANI, J. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>.

KELLY, P. J. et al. Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St.Kitts, West Indies. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053450>.

KJENTRUP, A. M.; CONRAD, P. A. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. **Veterinary Parasitology** v. 138, n. 1-2, p. 112-117, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.045>.

KORDICK, S.K. et al. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2631–2638, 1999.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará eastern Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 774-776, 2000. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-37.5.774>.

LABRUNA, M. B.; CAMPOS PEREIRA, M. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from the State of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.

LAPPIN, M. R. Update on the diagnosis and management of *Hepatozoon* spp. infections in dogs in the United States. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 142-144, 2010. <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2010.07.004>.

LASTA, C. S et al. Infecção por *Hepatozoon canis* em canino doméstico na região Sul do Brasil confirmada por técnicas moleculares. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2135-2140, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000160>.

LEISEWITZ, A. L. et al. The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, p.445-452, 2001.

LEMOS, T. D. et al. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 137-142, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000200012>

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Ames:Iowa State University Press. 1985.

LEVY, M. G. et al. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 3, p. 339–41, 1987.

LEWIS, B.D. et al. Isolation of South African vector-specific strain of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 63, p. 9-16, 1996.

LI, Y. et al. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 50-58, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.027>.

LIN, M.; HUANG, H. Use of a doxycycline-enrofloxacin-metronidazole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni*. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 52, p. 27, 2010. <http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-52-27>.

LITTLE, S. E. et al. New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. **Parasites and Vectors**, v. 2, supl. 1, 2009. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S5>.

LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian**, v.20, p.418–430, 1998.

LOBETTI, R.; DVIR, E.; PEARSON, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.63-68, 2002.

LOBETTI, R.G. Cardiac involvement in canine babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 76, n. 1, p. 4-8, 2005.

MACINTIRE, D. K. et al. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.220, p.325– 329, 2002.

MAIA, M. G. et al. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.79, n. 2-4, p.155–162, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.11.013>

MAKIMURA, S. et al. Three cases of *Hepatozoon canis* infection of dogs in Miyazaki Prefecture. **Journal of the Japanese Veterinary Medical Association**, v. 44, p. 928–932, 1991.

MARCHETTI, V. et al. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 1, p. 121-125, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2008.00080.x>

MASSARD, C. de A. *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) de cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. 1979. 121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural, Rio de Janeiro.

MASSARD, C. de A. et al. Ocorrência de *Babesia canis* Piana e Galli-Valério, 1895 (Piroplasmidae Babesiidae) em *Cerdocyon thous* L. no Brasil e sua transmissão ao cão doméstico (*Canis familiaris* L.) **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 28-45, 1981.

MASUDA, T. et al. Relapse of canine babesiosis after prednisolone treatment. **Modern Veterinary Practice**, v.64, p.931–932, 1983.

MATIJATKO, V. et al. Systematic inflammatory response syndrome and multiple dysfunction syndrome in canine babesiosis. **Veterinarski arhiv**, v. 80, n. 5, p. 611-626, 2010.

MATJILA, P. T. et al. Molecular characterisation of *Babesia gibsoni* infection from a pit-bull terrier pup recently imported into South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, n. 1, p. 2-5, 2007.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1504p.

MENN, B. et al. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 34, 2010. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-34>.



- MERCER, S. H.; CRAIG, T. M. Comparison of various staining procedures in the identification of *Hepatozoon canis* gamonts. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 17, n. 3, p.63-65, 1988.
- MIRANDA, F. J. B. et al. Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 238-241, 2008.
- MIRANDA, R. L. et al. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 392-396, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.044>
- MIRANDA, R. L. et al. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural áreas in Southeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 326-329, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.015>.
- MIYAMA, T. et al. Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 5, p. 467-471, 2005. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.67.467>
- MIYAMA, T. S. et al. Neutropenia associated with osteomyelitis due to *Hepatozoon canis* infection in a dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 10, p. 1389-1393, 2011. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.11-0202>
- MUNDIM, A. V. et al. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 359-361, supl. 1, 1992.
- MUNDIM, A. V.; MUNDIM, M. J. S.; BARBOSA, F.C. Hepatozoonosis canina. **Veterinária Notícias**, v. 8, n. 2, p.141-151, 2002.
- MUNDIM, A. V. et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 3-8, 2008a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.018>.
- MUNDIM, E. C. S. et al. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaios e Ciência**, v. 12, n. 2, p. 107-115, 2008b.
- MURASE, T. et al. Direct evidence for preferential multiplication of *Babesia gibsoni* in young erythrocytes. **Parasitology Research**, v. 79, n. 4, p. 269-271, 1993.
- MURATA, T. et al. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 5, p. 867-868, 1993.

MURATA, T. et al. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 1, p. 111–112, 1995.

MYLONAKIS, M. E. et al. Anti- *Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 229-233, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.01.012>.

O'DWYER, L. H. et al. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 83-84, 1997.

O'DWYER, L. H. et al. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural áreas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00378-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00378-2)

O'DWYER, L. H. et al. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 240-242, 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-004-1190-9>.

O'DWYER, L. H. et al. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 688-690, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000400039>.

O'DWYER, L. H. et al. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 23-26, 2009. <http://dx.doi.org/10.4322/rbvp.01802005>

O'DWYER, L. H. Brazilian canine hepatozoonosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 181-193, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000300002>.

OLICHESKI, A. T. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil.** 2003. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Doenças Parasitárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

OTRANTO, D. et al. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 55-60, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-55>.

OYAMADA, M. et al. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a Village of Eastern Sudan by using a screening PCR and

sequencing methodologies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1343-1346, 2005. . <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.12.11.1343-1346.2005>.

PALUDO, G. R. et al. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3-4, p. 243-248, 2003. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.009>

PASA, S. et al. Failure of combination therapy with imidocarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 919-928, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s0043-011.2334-3>.

PASSOS, L. M. et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.028>.

PAULAN, S.C. et al. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 162-166, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-2961203000100031>.

PAULAUSKAS, A. et al. Detection and molecular characterization of canine babesiosis causative agent *Babesia canis* in the naturally infected dog in Lithuania. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 702-706, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.001>

RAMOS, R. et al. Molecular survey and characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1979-7>.

RAMOS, R. et al. Incidence of *Cercopithifilaria bairnei* in dogs and probability of co-infection with other tick-borne pathogens. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088198>

RENÉ-MARTELLET, M. et al. Diagnosis and incidence risk of clinical canine ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasites and Vectors**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0613-4> *in press*

RIBEIRO, M.F.B. et al. Frequência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.42, n.6, p. 511-517, 1990.

ROJAS, A. et al. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. **Veterinary Parasitology**, v. 199, p. 121-128, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>.

- RUBINI, A. S. et al. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v. 97, n. 2, p. 91–93, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-005-1383-x>
- RUBINI, A. S. et al. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 895-899, 2008. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0846-7>.
- RUBINI, A. S. et al. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 324-327, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.009>.
- SAKUMA, M. et al. Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 3, p. 493-498, 2009a. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0300.x>.
- SAKUMA, M. et al. A case report: a dog with acute onset of *Hepatozoon canis* infection. The **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 6, p. 835-838, 2009b. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.71.835>.
- SALGADO, F. P. **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.
- SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v.179, p. 145–148, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.017>.
- SASAKI, M. et al. A PCR-Based Epidemiological Survey of *Hepatozoon canis* in Dogs in Nigeria. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 7, p. 743-745, 2008. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.70.743>.
- SASANELLI, M. et al. Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. **Veterinary Record**, v. 164, n. 1, p. 22-23, 2009. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.164.1.22>.
- SASANELLI, M. et al. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 194-199, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.042>.

SCHETTERS, T. P. et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, p. 485-493, 1997.

SCHETTERS, T. P. et al. Parasite localisation and dissemination in the Babesia-infected host. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.92, p.513–519, 1998.

SCHETTERS, T. P. et al. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 7-15, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.012>.

SHIMADA, Y. et al. Ixodid tick species recovered from domestic dogs in Japan. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p.38-45, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00403.x>.

SHKAP, V. et al. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 121–123, 1994.

SIKORSKI, L. E. et al. Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 127-131, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939.1676.2009.0440.x>.

SILVA, A. B. et al. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na mesorregião do oeste maranhense, nordeste brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 388-395, 2012. <http://dx.doi.org/10.5216/cab.v13i3.18439>

SILVA, M. C. A. et al. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, 2014.

SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 565-585, 1993.

SMITH, T. G. et al. The development of *Hepatozoon sipedon* sp. (Apicomplexa: Adeleorina:Hepatozoidae) in its natural host, the northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. irritans*, and in an intermediate host, the northern leopard frog (*Rana pipiens*). **Parasitology Research**, v. 80, n. 7, p. 559-568, 1994.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.211–221, 2008.

SOUSA, K. C. M. et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 525-531, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000400012>.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n 1, p. 201-206, 2010. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0595>.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 253-255, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000300015>.

SUSUKI, K. et al. A possible treatment strategy and clinical factors estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 5, p. 563-568, 2007. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.69.563>

SVEHLOVÁ, A. et al. Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemophysalis concinna* ticks and *Rickettsia* and *Babesia* species in Slovakia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 600-605, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.010>

TABOADA, J. et al. Seroprevalence of Babesiosis in Greyhounds in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n.1, p. 47-50, 1992.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Infecções por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997, p.554-572.

TABOADA, J. Babesiosis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p. 473-481.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In Greene, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier, 2006. p. 722-736.

TRAPP, S.M. et al. Babesiose canina. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária – pequenos animais**. v. 2, n.7, p. 211-217, 2004.

TRAPP, S. M. et al. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.141, n. 1-2, p.177-180, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.036>.

VALLI, V. E. O. Hematopoietic system. In: MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, p.107-324.

UILENBERG, G. et al. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, 11: 33-40, 1989.

UILENBERG, G. *Babesia* - A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n. 1-2, p. 3-10, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

UNGAR DE SÁ, M. F. M. et al. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 178-183, 2007.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G. et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 254-260, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>

VERCAMMEN, F. et al. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. **Veterinary Parasitology**, v.68, n. 1-2, p.51-55, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01063-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01063-1)

VIDOTTO, O., TRAPP, S.M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.13, p.58-61, 2004.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural áreas from Parana state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000100019>.

VILELA, J. A. R. et al. Alterações clínico-hematológicas de infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do Município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 1, p. 63-68, 2013.

VOTJA, L. et al. Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1129-1136, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.007>.

WANG, C. et al. Frequency and therapy monitoring of canine *Babesia* spp. Infection by high-resolution melting curve quantitative FRET-PCR. **Veterinary Parasitology**, 168, p. 11-18, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.015>.

WELZL, L. C. et al. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 72, n. 3, p. 158-162, 2001.

WENYON, C. M. Some remarks on the genus *Leucocytozoon*. **Parasitology**, v. 5, p. 63-72, 1910.

WLOSNIIEWSKI, A. et al. Etude du portage asymptomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, n. 1, p.75–86, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-9571\(96\)00020-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-9571(96)00020-3).

YANCEY, C. B. et al. Regional seroreactivity and vector-borne disease co-exposures in dogs in the United States from 2004-2010: utility of canine surveillance. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v. 14, n.10, p. 724-732, 2014. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1592>.

YISASCHAR-MEKUZAS, Y. et al. Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 3-4, p. 367-373, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.002>.

ZAHLER, M. et al. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, v. 84, n. 7, p. 544-548, 1998. <http://dx.doi.org/10.1007/s004-360050445>.

ZAHLER, M. et al. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 241-248, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00202-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00202-8)

ZAMBELLI, A. B.; LEISEWITZ, A. L. A prospective, randomized comparison of oxyglobin (HB-200) and packed red blood cell transfusion for canine babesiosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 102-112, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00386.x>

ZANETTE, M.F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n. 1, p. 105-107, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>.



**APÊNDICE**

**PROJETO – Babesiose e Hepatozoonose caninas em cães de  
Ituberá, Bahia, Brasil  
Questionário clínico e epidemiológico**

**Proprietário**

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Zona: ( ) rural\* ( ) urbana

Telefone: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: ( ) F ( ) M

**Animal**

Nome: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F

Idade: \_\_\_\_\_

Onde o cão foi adquirido?

( ) no domicílio atual ( ) outro \_\_\_\_\_

Em qual lugar do domicílio o cão fica a maior parte do tempo?

( ) dentro de casa ( ) fora de casa ou quintal

Onde o cão dorme? ( ) quintal ( ) dentro de casa, no cômodo \_\_\_\_\_

Você adquiriu outro cão? ( ) S ( ) N

O domicílio, mesmo que esporadicamente, é visitado por:

( ) gato ( ) roedores ( ) gambás ( ) cães errantes ( ) Outro: \_\_\_\_\_

Quais cuidados veterinários o seu cão recebe?

Sempre levo ao veterinário

Nunca levo ao veterinário

### Exame físico do animal

Coloração das mucosas:

icterícia

anemia

petéquias

Sangramentos:  Sim  Não

Hidratação:  Sim  Não

Petéquias:  Sim  Não

Descrever: \_\_\_\_\_

Carrapatos:  Sim  Não

Diarréia:  Sim  Não

Vômito:  Sim  Não

Linfonodos:  Alterados  Normais

Tempo de sangramento: \_\_\_\_\_

Assinatura do proprietário: \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES** \_\_\_\_\_

---

\*Entende-se por zona rural o ambiente onde se localizam fazendas, chácaras ou pequenas propriedades rurais, afastadas da cidade (dados fornecidos pela Secretaria do Município de Ituberá)