



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

MARIA LUIZA FARIAS LIMA

**DIAGNÓSTICO DE HEMATOZOÁRIOS, AVALIAÇÃO
HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA EM *Cerdocyon thous*
(CARNIVORA, CANIDAE) PROVENIENTES DO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

RECIFE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DE HEMATOZOÁRIOS, AVALIAÇÃO
HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA EM *Cerdocyon thous*
(CARNIVORA, CANIDAE) PROVENIENTES DO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

MARIA LUIZA FARIAS LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DE HEMATOZOÁRIOS, AVALIAÇÃO
HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA EM *Cerdocyon thous*
(CARNIVORA, CANIDAE) PROVENIENTES DO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Elaborada e defendida por

MARIA LUIZA FARIAS LIMA

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dra. Andréa Maria Campos Calado
Médica Veterinária

Dra. Débora Rochelly Alves Ferreira
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Profa. Dra. Márcia Paula Oliveira Farias
UFPI/ CPCE

À minha guerreira e amada mãe, Edineide.

Amor e dedicação incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradecer faz bem a alma e é através dele que firmamos o reconhecimento de ajuda e apoio os quais sozinha não teria sustentação para continuar. E por isso, o primeiro agradecimento será sempre a Deus, o Amor maior, base e essência de tudo para tudo. Foi Nele a quem recorri em todos os momentos, da dúvida e desmotivação às graças alcançadas e a explicação dos porquês de todos os momentos desses últimos dois anos. Nossa Senhora de Fátima, São Miguel Arcanjo e São Francisco de Assis que sei que sempre intercederam por mim junto ao Pai, trazendo serenidade e calma em vários momentos.

Ao meu pai, José Luiz, que mesmo não estando mais aqui fisicamente, se faz presente nas lembranças e nos sonhos, me trazendo determinação e coragem para enfrentar qualquer situação da vida.

À minha mãe, Edineide, por toda paciência e compreensão em saber lidar com minha impaciência, mau humor e rispidez. Por saber amar como nenhuma outra mãe amou toda sua família, por saber ser forte mesmo temendo, sendo firme em meio as tempestades dos últimos anos.

Ao meu irmão, Gustavo, que desde o começo de tudo sempre torceu por mim, me admirando por uma capacidade e astúcia que só ele sabe descrever sorrindo.

A minha sobrinha linda e amada, Mariazinha, que correu tanto comigo depois da escola para me acompanhar na saga do dia a dia, sempre feliz e de bom humor, adorando todo o corre-corre e peripécias que a gente encarou juntas, sem reclamar e sempre querendo estar comigo.

A irmã de coração que a vida me deu, Paola, a quem tanto amo, admiro e me orgulho, por toda a paciência que ela já gastou comigo em quase dez anos, pela confiança a mim depositada em âmbitos pessoal e profissional. Por tudo, tudo mesmo agradeço e peço perdão pelas falhas que cometi e que não foram poucas.

Ao casal Neurisvan e Hévila, que desde a seleção me tratam com muito carinho e atenção, sem eles esse trabalho não estaria completo. Obrigada por todas as ajudas prestadas, não só na biologia molecular, mas nos momentos de ouvir e falar sobre assuntos acadêmicos e pessoais. Vocês foram minha “mão na roda” em diversas situações e espero poder dar este retorno a vocês também.

A André Santos, que caiu de paraquedas na minha profissional como um anjo com toda a paciência do mundo para me ajudar e explicar diversas vezes sobre tantas dúvidas bobas.

A Edna Michelly que foi parceira pra me situar na “caça às raposas”, me ajudando com tanta burocracia e correndo e me levando junto na conquista de cada etapa alcançada. Muito obrigada por tudo, FT!

A professora Maria Aparecida da Gloria Faustino, sempre muito compreensiva, não tenho palavras para expressar o carinho e atenção até os últimos minutos da dissertação. Muito obrigada, professora!

A todos os colegas do LDP que tive o prazer de reencontrar, conhecer e conviver, todos vocês foram ótimos comigo, sempre que nos encontramos sorrisos surgiram mesmo com todo desgaste e cansaço. Valeu por tudo galera, Márcia Paula, Nadine, Sandrinha, Nanda, Luciana, Francine, Júlio, Glaucia e Edson, contem comigo mesmo fora da universidade.

Aos meus amigos pessoais que ouviram tantos desabafos e histórias, que acompanharam indiretamente o corre-corre e estresse, só posso agradecer a existência de vocês, porque mesmo com todo apherreio que só vocês sabem me causar, eu não teria tido tanta distração e descanso no juízo para espairecer sobre tudo. Meu muito obrigada a Diego, Gabi, Marima, Ka, Mirna, Crika, Natacha, Thio, Cris, Uóli, Papito, Nattte, Ercalb, Rochelly, Funny, Marcelinho, Rafael, Marie, Thaiza, Gabi Borba.

E por último, mas não menos importante, meu orientador e sempre professor Leucio Câmara Alves, o causador de tudo isto, do princípio ao fim. Do convite ao mestrado, passando pela realização do projeto, até aqui, a defesa. Só posso agradecer a paciência e confiança depositadas, a qual espero não ter comprometido com tantas falhas. Saiba que o senhor foi instrumento divino para que hoje eu estivesse aqui, a realização deste mestrado teve um propósito na minha vida acima e além do aspecto profissional e científico. Espero não tê-lo decepcionado e sempre que estiver ao meu alcance, ajudarei e contribuirei com um grande pedaço de sua vida, o Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A vida tem quatro sentidos:

Amar, sofrer, lutar e vencer...

Por isso ame muito, sofra pouco, lute bastante e vença sempre!

RESUMO

Doenças transmitidas por carrapatos são as enfermidades mais comuns em cães domésticos em algumas partes do mundo. Embora poucos estudos tenham sido realizados para elucidar sobre esses patógenos em canídeos silvestres, o objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis vogel*, além dos perfis hematológicos e bioquímica sérica em Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*). Foram coletadas amostras de sangue de 18 animais de cativeiro e dois de vida livre de diferentes áreas do estado de Pernambuco, Brasil. As amostras sanguíneas foram utilizadas para a pesquisa do protozoário e das bactérias por meio de exame de esfregaços de sangue e também para realização de hemograma e bioquímica sérica. O teste rápido Snap 4Dx® foi utilizado para detecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para identificar *B. canis* e da nested PCR (nPCR) para *E. canis* e *A. platys*. Os resultados do exame direto não mostraram a presença de patógenos. Alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos apresentaram alterações, particularmente em série vermelha, plaquetas, proteína total e alanina aminotransferase. Os anticorpos anti *Ehrlichia* e anti *Anaplasma* foram encontrados em 15% dos animais. *B. canis* não foi encontrada em quaisquer amostras da PCR. Dos animais investigados, 45% e 5% foram positivos por nPCR para *E. canis* e *A. platys*, respectivamente. O presente estudo relata pela primeira vez a evidência sorológica de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. e a primeira detecção molecular de *A. platys* em *C. thous*.

Palavras-chave: canídeo silvestre, patologia clínica, biologia molecular, medicina da conservação

ABSTRACT

Tick-borne disease is the most common disease in domestic dogs in some parts of the world. Although, few small studies have been carried out to elucidate these pathogens in wild canids. The goal of this study was the objective to investigate the occurrence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and also hematological, serum biochemistry profiles of Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*). Blood samples were collected from 18 captive and two free living animal of different areas of Pernambuco State, Brazil. The blood was used not only to determine the intraerythrocytic protozoan and bacteria species through the examination of blood smears, but also a complete blood cell count (CBC) and the profile of the serum biochemistry. The Snap test was used as quick serological tests for detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. and the Polymerase Chain Reaction was used to identify *B. canis* and the nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) was run to *E. canis* and *A. platys*. The results showed no tick borne pathogens by using conventional examination of stained blood smears. Some hematological and serum biochemical parameters were changed particularly red blood cell count, platelets, total protein and alanine amino transferase. Antibodies against *Ehrlichia* and *Anaplasma* species were found in 15% of animals. *Babesia canis* were not found any samples by PCR. Of the animals investigated, 45% and 5% were positive by nPCR to *E. canis* and *A. platys* respectively. The present study reports for the first time the serological evidence of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. and the first *A. platys* molecular detection in *C. thous*.

Keywords: wild canid, clinical pathology, molecular biology, conservation medicine

SUMÁRIO

	Pág
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 <i>Cerdocyon thous</i>	13
2.2 Rickettiose.....	14
2.3 Ehrlichiose.....	15
2.4 Anaplasmose.....	16
2.5 Babesiose.....	17
2.6 Hematologia e bioquímica em canídeos silvestres.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Animais.....	20
3.2 Processamento laboratorial.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5 CONCLUSÕES.....	30
6 REFERÊNCIAS.....	31
7 ANEXOS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Os animais silvestres da fauna brasileira habitualmente são encontrados na vida silvestre ou em cativeiro, onde podem ser reservatórios e portadores de zoonoses (ACHA; SZYFRES, 1986).

As modificações na estrutura demográfica dos animais silvestres causadas pela ocupação humana de ambientes naturais podem gerar um contato entre o homem e os animais silvestres de fundamental na manutenção do ciclo enzoótico reforçando a importância das macro e micro biota silvestre e sua repercussão na saúde humana e animal (TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001).

Nestas situações, muitas espécies de pequenos mamíferos, principalmente de hábitos sinantrópicos, são facilmente afetados por modificações do ambiente (OLIVEIRA, 2008).

Neste contexto, a presença de canídeos silvestres em áreas urbanas ocorre em função da ocupação humana no habitat destas espécies, notadamente áreas vizinhas a reservas ecológicas, onde os canídeos domésticos (GOMES, 2006) e o homem são susceptíveis aos agentes infecciosos e parasitários de origem silvestre, particularmente aqueles transmitidos por vetores ixodídeos (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006).

Como consequências dessas interações podem ocorrer zoonoses com expansão epidêmica de animais suscetíveis e o aumento da sua disseminação geográfica (SILVA, 2008).

Entre os canídeos silvestres da fauna brasileira, *Cerdocyon thous*, conhecido como cachorro-do-mato, apresenta médio porte (BEISIEGEL et al., 2013) e comportamento tipicamente generalista, podendo encontrar-se em diversos habitats (FARIA-CORRÊA et al., 2009), sendo tolerante às modificações causadas pela presença do homem mas não ao processo de urbanização (BEISIEGEL et al., 2013).

A presença de patógenos que possam interferir na sanidade dessas populações, levando ao processo de extinção, causa uma preocupação na medicina da conservação, onde se faz necessária uma avaliação da sanidade destas populações (LAURENSEN et al., 1998; SILVA; LIMA; SANCHES, 2004; MATTOSO et al., 2012).

Esses dados podem subsidiar programas de conservação destes canídeos, contribuindo para o melhor conhecimento da relação parasito x hospedeiro (FAIRBROTHER; O'LOUGHLIN, 1990; SILVA; LIMA; SANCHES, 2004) e seu envolvimento com diferentes agentes.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência da infecção por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis*, bem como a avaliação hematológica e bioquímica de *C. thous* no estado de Pernambuco, Brasil

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Cerdocyon thous*

A família Canidae pertence à ordem Carnívora e está representada por 13 gêneros e 35 espécies (GOMES, 2006), estando distribuída em todo globo terrestre, com exceção da Antártida (ALMEIDA, 2011).

Embora apresentem um padrão anatômico relativamente uniforme, com variação da cor às suas dimensões (GOMES, 2006), a classificação taxonômica dos gêneros baseia-se na morfologia, cariótipo e biologia molecular (ALMEIDA, 2011),

Na América do Sul encontram-se cinco gêneros e nove espécies, sendo que seis dessas ocorrem no Brasil: *Atelocynys microtis*, *Chrysocyon brachyurus*, *Speothos venaticus*, *Cerdocyon thous*, *Pseudalopex vetulus* e *Pseudalopex gymnocercus* (GOMES, 2006).

C. thous, conhecido como cachorro-do-mato, animal de médio porte (FARIA-CORRÊA et al., 2009; BEISIEGEL et al., 2013), maturidade sexual entre um e dois anos de idade, período de gestação de 55 a 60 dias, apresentando normalmente um ou dois partos por ano com ninhadas que variam entre dois e 13 indivíduos (GOMES, 2006).

É tipicamente um animal generalista, com hábitos oportunistas, alimentando-se de frutos, insetos, crustáceos, pequenos invertebrados e vertebrados, ovos de diversas espécies e até mesmo de carcaças de animais domésticos e silvestres (FARIA-CORRÊA et al., 2009; BEISIEGEL et al., 2013), podendo encontrar-se em diversos habitats de savanas às florestas, do nível do mar até altitudes superiores a 2000 metros (FARIA-CORRÊA et al., 2009), sendo tolerante à perturbações antrópicas, porém não à urbanização (BEISIEGEL et al., 2013).

No Brasil, *C. thous* pode ser encontrado em todo o país, exceto nas terras baixas da região amazônica (FARIA-CORRÊA et al., 2009; BEISIEGEL, 2013).

Do ponto de vista da medicina da conservação, *C. thous* não é considerado uma espécie em extinção (GOMES, 2006; ALMEIDA, 2011; BEISIEGEL et al., 2013) sendo considerada como Menos Preocupante (LC) pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2008), por ser relativamente comum ao longo de sua área de distribuição, ocupando a maioria dos habitats, e por suas populações

serem geralmente consideradas estáveis, embora não haja estimativas precisas de tamanho populacional (BEISIEGEL et al., 2013).

A ocorrência de canídeos silvestres em reservas ecológicas próximo de áreas urbanas é extremamente importante, uma vez que geralmente estes animais ocupam altas posições tróficas nestes ambientes, desempenhando um papel ecológico importante na comunidade (FARIA-CORRÊA et al., 2009), estando suscetíveis a mesma gama de agentes infecciosos e parasitários que acometem os canídeos domésticos, assim como ectoparasitos (GOMES, 2006).

Pela susceptibilidade a ectoparasitos, infestações por *Rhipicephalus sanguineus*, em cachorro-do-mato, lobo-guará e raposinha-do-campo (GOMES, 2006; SANTOS, 2008) tem sido reportada, o que abre a perspectiva de transmissão de agentes patogênicos como *Rickettsia rickettsii*, *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. (GOMES, 2006).

2.2. Rickettsioses

Algumas doenças podem surgir de forma epidêmica, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade causando grande impacto nas populações animal e humana (REIS, 2012). Representadas pelos gêneros *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella* e *Ehrlichia* (CALIC, 2004; MACEDO, 2007), as rickettsioses são enfermidades causadas por bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias (CALIC, 2004; ALMEIDA, 2011).

Com distribuição cosmopolita (CALIC, 2004; ESTEVES, 2007; REIS, 2012), todos os agentes patogênicos das rickettsioses de caninos e felinos requerem um artrópode hematófago para manutenção da cadeia epidemiológica (ALLISON; LITTLE, 2013), particularmente carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros (CALIC, 2004; ALMEIDA, 2011) que ao realizarem o repasto sanguíneo transmitem estes patógenos (ALLISON; LITTE, 2013).

Na cadeia epidemiológica, roedores silvestres, capivaras e gambás são considerados reservatórios dessas bactérias (LABRUNA et al., 2009; ALMEIDA, 2011). Na Itália, a raposa vermelha é apontada como potencial reservatório de *Anaplasma phagocytophilum* devido à alta prevalência desse patógeno nessa espécie sem causar doença clínica (EBANI et al., 2011).

Possuindo variabilidade clínica de infecção inaparente à grave doença, cães domésticos acometidos por *Rickettsia* sp. podem apresentar febre, letargia, mialgia, trombocitopenia e evoluir ao óbito (MASSARD; FONSECA, 2004; ALLISON; LITTE, 2013).

O diagnóstico das rickettsioses pode ser realizado através de exame direto (ALLISON; LITTE, 2013) ou através das técnicas sorológicas (PUSTERLA et al., 2000), que confirmam a suspeita clínica da infecção, levando em consideração a possibilidade de reações cruzadas entre infecção por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (ALLISON; LITTE, 2013).

Neste sentido, infecções por *Ehrlichia* spp. em coiotes (*Canis latrans*) (PUSTERLA et al., 2000), *Ehrlichia canis* em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (AMYX; HUXSOLL, 1973; PUSTERLA et al., 1999) e raposa cinza (*Urocyon cinereoargenteus*) (AMYX; HUXSOLL, 1973) e *Anaplasma* spp. em raposas vermelhas (EBANI et al., 2011) têm sido reportadas.

2.3. Ehrlichiose

A infecção por *E. canis* ocorre em muitos países de clima temperado, tropical e subtropical, coincidindo com a prevalência do seu vetor *R. sanguineus* (ALMOSNY, 2002). No Brasil, sua incidência tem aumentado em todo país (VIEIRA et al., 2011) sendo considerada causa importante de morbidade e mortalidade na clínica de pequenos animais.

No Brasil, ehrlichiose canina foi primeiramente descrita em 1973 (COSTA et al., 1973) e apesar de sua ampla distribuição, só teve seu isolamento obtido em 2002 (DANTAS-TORRES, 2008; ALMEIDA, 2011).

E. canis é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa (DUMLER et al., 2001), cocoide pleomórfica pequena (SILVA et al., 2011; MORALES, 2013), transmitida pelo *R. sanguineus* (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007; DANTAS-TORRES, 2010; EBANI et al., 2011; SILVA et al., 2011), que infecta o citoplasma de leucócitos, principalmente monócitos e linfócitos (MCBRIDE et al., 2001; ALMOSNY, 2002; ESTEVES, 2007; MORALES, 2013).

A doença canina é de difícil diagnóstico clínico por possuir várias características atípicas em cães naturalmente infectados (ALMOSNY, 2002; SILVA

et al., 2011), sendo então baseado no histórico e nas alterações hematológicas (DAGNONE et al., 2001; MANOEL, 2010). Os cães que evoluem da fase aguda da doença ou aqueles que recebem tratamento inadequado progridem para a fase crônica (HARRUS; BARK; WANER, 1997; MANOEL, 2010).

Em canídeos silvestres, a infecção por *E. canis* tem sido observada em raposas vermelhas e raposas cinzas em infecção experimental, sem entretanto causar doença clínica, sendo apenas visibilizado um quadro de trombocitopenia e leucopenia (AMYX; HUXSOLL, 1973).

A identificação de mórula de *E. canis* no citoplasma das células mononucleares do sangue periférico é o exame mais comumente realizado (ALMOSNY, 2002; SILVA et al., 2011), mas é considerado um achado circunstancial em função da baixa bacteremia (HARRUS; BARK; WANER, 1997; DAGNONE et al., 2001).

Por outro lado, a infecção por *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, IgM e IgG, que podem ser observados na circulação sanguínea sete a 15 dias após a infecção (DAGNONE et al., 2001; WANER et al., 2001; MANOEL, 2010), possibilitando o diagnóstico sorológico da infecção.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular possibilitou a detecção precoce da infecção por *E. canis*, o que trouxe novas perspectivas de diagnóstico (MANOEL, 2010) para confirmação clínica (MCBRIDE et al., 1996; HARRU; BARK; WANER, 1997).

2.4. Anaplasmosose

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria intracitoplasmática que possui caráter zoonótico, sendo transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes*, podendo acometer equinos, caninos e felinos domésticos e silvestres (RIKIHISA, 2006; CARRADE et al., 2009; ALMEIDA, 2011; EBANI et al., 2011), que infecta os granulócitos, predominantemente os neutrófilos, mas também os eosinófilos (CARRADE et al., 2009; ALMEIDA, 2011).

Anaplasma platys, é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta plaquetas de caninos domésticos (DAGNONE et al., 2001; ARRAGA-ALVARADO et al., 2003; MACHADO, 2004; SANTARÉM, 2005; TRAPP et al., 2006; FERREIRA et

al., 2007; MACEDO, 2007; DANTAS-TORRES, 2008; ALMEIDA, 2011) e felinos domésticos (LIMA et al., 2010) induzindo a trombocitopenia cíclica, possuindo como provável vetor o carrapato *R. sanguineus* (DAGNONE et al., 2001; ARRAGA-ALVARADO et al., 2003; MACHADO, 2004; SANTARÉM, 2005; TRAPP et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; MACEDO, 2007; DANTAS-TORRES, 2008; ALMEIDA, 2011).

Infecção por *A. phagocytophilum* tem sido reportada em coiotes (STARKEY, 2013), raposas vermelhas (EBANI et al., 2011) e raposas cinza (GABRIEL et al., 2009). Contudo, a real taxa de infecção pode estar superestimada em função de reação cruzada com *A. platys*, (SUKSAWAT et al., 2001; SUKSAWAT et al., 2002; CARRADE et al., 2009).

Devido à natureza cíclica da doença, sua descoberta em estiraços sanguíneos é normalmente acidental, tornando o método impreciso e com baixa frequência, principalmente nas fases de trombocitopenia (MARTIN et al., 2005; FERREIRA et al., 2007)

2.5. Babesiose

A babesiose é uma doença de canídeos domésticos e silvestres (GUIMARAES; OLIVEIRA; SANTA-ROSA, 2002; PASSOS et al., 2005; DUARTE, 2007; MATIJA et al., 2008; SANTOS, 2008; VASCONCELOS, 2010; CARDOSO et al., 2013), transmitida por vetores ixodídeos (PASSOS et al., 2005; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; SANTOS, 2008; CARDOSO et al., 2013), podendo apresentar alta patogenicidade (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006).

São conhecidas duas espécies do gênero *Babesia* capazes de provocar infecção natural em caninos domésticos: *Babesia gibsoni* e *Babesia canis*, sendo esta última classificada em três sub-espécies: *B. canis canis*, encontrada na Europa, *B. canis vogeli*, no Norte da África, América do Norte e Brasil e *B. canis rossi* encontrada no Sul da África (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; DUARTE, 2007; IRWIN, 2009; CARDOSO et al., 2013).

A doença canina é endêmica no Brasil (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; VASCONCELOS, 2010), com transmissão realizada por carrapatos da família Ixodidae, particularmente a espécie *R.*

sanguineus (OLICHESKI, 2003; PASSOS et al., 2005; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; SANTOS, 2008).

Contudo, pouco se sabe sobre sua ocorrência, transmissão e outros aspectos epidemiológicos nas áreas rurais e silvestres (LABRUNA; PEREIRA, 2001; COSTA-JÚNIOR et al., 2009).

Há relatos que *B. canis* em cães domésticos pode ser transmitida de forma natural e experimental para cães silvestres africanos (*Lycaon pictus*) e chacais (*Canis mesomelas*) na África do Sul (MATJILA et al., 2008; FLACKE, et al., 2010) e *B. gibsoni* em coiotes infectados experimentalmente (EVERS et. al., 2003), além da detecção e caracterização molecular de *B. canis rossi* em cães silvestres africanos (MATJILA et al., 2008; FLACKE, et al., 2010) e *Babesia* spp. em raposas vermelhas (CARDOSO et al., 2013)

No Brasil, a ocorrência de babesiose em lobos-guará tem sido observada como causa de anemias hemolíticas e mortalidade (PASSOS et al., 2005; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; GOMES, 2006).

Além disso, outras espécies de protozoários como *Rangelia vitalli* em *C. thous* (SOARES et al., 2014) e *Babesia microti*-like, em raposas vermelhas, coiotes e raposas cinzas (BIRKENHEUER et al., 2010) têm sido relatadas.

2.6. Hematologia e bioquímica em canídeos silvestres

A patologia clínica/ medicina laboratorial é uma especialidade direcionada à realização de exames complementares no auxílio ao diagnóstico, com impacto nos diferentes estágios da cadeia de saúde: prevenção, diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico (CAMPANA; OPLUSTIL; FARO, 2011).

O hemograma é o exame de maior rotina, onde através de seus parâmetros confirmam ou eliminam um diagnóstico presuntivo, além de auxiliar ainda em um prognóstico mais acurado (COLES, 1984).

Já a dosagem de enzimas bioquímicas faz parte de uma série de exames abrangentes, planejados para descobrir a natureza de um processo patológico, que associado a outros exames laboratoriais e avaliação clínica, auxiliam no diagnóstico final, formação de prognóstico e no acompanhamento da eficácia do tratamento escolhido (COLES, 1984)

Na medicina de animais silvestres, os exames laboratoriais já podem ser considerados como importante ferramenta no diagnóstico de prevenção doenças e até mesmo como biomarcadores de agressões ambientais, uma vez que a sanidade do ambiente influencia na vida dos seres que interagem com essas espécies (GOMES, 2006; MATTOSO et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 20 indivíduos da espécie *C. thous* sendo um animal de cativeiro da Região Metropolitana de Recife; dois animais de vida livre capturados no município de Petrolina (09° 23' S, 40° 28' O); seis animais provenientes do Centro de Conservação e Manejo da Fauna de Petrolina – CEMAFUNA – Petrolina (9° 23' S e 40° 30' O); oito animais provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Recife (CETAS/ RECIFE (8° 3' S e 34° 52' O), e três animais do Parque Estadual de Dois Irmãos Recife (8° 9' S e 34° 52' O). Em todas as áreas de estudo existe população humana e animais domésticos de companhia e/ ou produção em seu entorno.

Para a captura dos animais de vida livre, foram utilizadas armadilhas de modelo *Tomahawke Sherman*, do tipo *Live trap* que foram dispostas no solo. As armadilhas foram monitoradas diariamente durante um período de duas semanas. Pedacos de carne de frango foram utilizados como isca nas armadilhas. Após captura, os animais foram contidos de forma física, utilizando-se puçá e luvas de raspas de couro. A contenção física também foi realizada da mesma forma para os animais de cativeiro.

Após serem contidos fisicamente, todos os animais receberam a associação dos fármacos cloridrato de cetamina na dose de 8 mg/kg e cloridrato de xilazina na dose de 0,8 mg/kg (GOMES, 2006) para contenção química. Durante o procedimento, os animais foram monitorados por parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura) e inspecionados quanto a presença de ectoparasitos.

Foram coletados 5 mL de sangue pela veia jugular e/ ou cefálica, com seringa e agulha. As amostras sanguíneas foram transferidas para tubos de ensaio estéreis contendo EDTA a 10% e outros contendo ativador de coágulo, para posterior análise. Ao término do manejo dos animais, foi aguardado o restabelecimento dos mesmos após contenção química para posterior liberação ao recinto ou vida livre.

3.2. Processamento laboratorial

O material coletado em EDTA ainda fresco foi utilizado para a realização dos parâmetros hematológicos, pesquisa de hemoparasita e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*.

Foram confeccionados três estiraços sanguíneos para a pesquisa, sendo uma das lâminas utilizada para a contagem de plaquetas, leucócitos diferenciais e avaliação morfológica das células. O volume globular foi obtido pelo método do micro-hematócrito (COLES, 1984) e determinação da proteína plasmática total por refratometria. A contagem de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais feitas em aparelho semi automatizado (contador de células hematológico CELM CC 550 e diluidor 500®) e a leitura da lâmina realizada em microscópio óptico em aumento de 40x.

As amostras de soro obtidas pós retração do coágulo e centrifugação (3.000 rpm/ 5 min) dos tubos de ensaio sem anticoagulante foram utilizadas para a realização de teste sorológico ELISA imunocromatográfico com os kits Snap 4Dx Plus® para a detecção de anticorpos anti- *E. canis*/ *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*/ *A. platys*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis*. Os testes foram realizados conforme instrução do fabricante.

O soro obtido foi ainda processado em aparelho semi-automatizado TP-Analyzer Basica – Thermo Plate® com kits da Doles®, conforme instruções do fabricante, para a determinação das dosagens de bioquímica sérica de uréia, creatinina, aspartado aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamiltransferase (GGT), albumina, cálcio, fósforo e proteína total.

Para realização de diagnóstico molecular, foi realizada a extração de DNA do sangue total coletado em EDTA com kit comercial da Qiagen, conforme instruções do fabricante (protocolo em anexo).

Através da técnica de Nested PCR (nPCR) fez-se a amplificação de DNA de *E. canis* e *A. platys* e através de PCR convencional, a detecção para *B. canis vogeli*.

Na primeira etapa da nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos ECC e ECB para *E. canis* e 8F e 1448R para *A. platys*, com os componentes da mistura,

utilizou-se 94° por 1 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min para *E. canis* e 45° para *A. platys*, e extensão a 72°C por 40 seg. Após amplificação foram separados 2ul do produto obtido nesta primeira PCR para utilização na segunda etapa da nPCR.

Na segunda etapa, foram *utilizados oligonucleotídeos* iniciadores HE3 e ECAN5 para *E. canis* e PLATYS-F e EHR16S-R para *A. platys*, que geraram fragmentos de 389 pb e 678 pb, respectivamente, segundo protocolos descritos por Wen et al. (1997) e Martin et al. (2005), respectivamente, em anexo.

Na PCR convencional, foram *utilizados os oligonucleotídeos* BAB1 e BAB4, para amplificação de 590 pb, para detecção de *B. canis vogeli*, segundo Duarte et al. (2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos estiraços sanguíneos corados não revelaram a presença de *E. canis*, *A. platys* e *B. canis*. Esses resultados são concordantes com Mattoso et al., 2012 e Rabelo (2014) que não detectaram hemoparasitos em amostras sanguíneas de *C. thous*.

Apesar do diagnóstico das rickettsioses ser realizado através de exame direto (ALLISON; LITTE, 2013), a detecção de *E. canis* e *A. platys* em estiraços sanguíneos em cães é dificultada em função da bacteremia transitória, natureza cíclica (MARTIN et al., 2005; FERREIRA et al., 2007) e a pequena quantidade de mórulas circulantes (HARRUS; BARK; WANER, 1997; CARRADE et al., 2009; tanto na fase aguda como na crônica (WOODY; HOSKINS, 1991).

O método de diagnóstico direto, apesar da rapidez e economia pode originar em resultados falsos negativos para hemoparasitose de caninos domésticos, particularmente para *B. canis* (TABOADA; LOBETTI, 2006; IRWIN, 2009; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011).

Neste contexto, a ausência de infecção por *B. canis* em cães pode ser devido a fase da infecção (PAINE, 1934; SCHALM; JAIN; CARROL, 1975), e a baixa parasitemia, que dificulta o encontro do protozoário (BREITSCHWEDT et al., 1983; HAGIWARA; HOLZCHUH, 1987).

Tendo em vista a baixa sensibilidade do exame direto, acredita-se que a mesma situação pode ocorrer na pesquisa de hematozoários em canídeos silvestres.

O resultado dos exames sorológicos evidenciaram 10% (2/20) dos animais reagentes para *Ehrlichia* spp. e 5% (1/20) para infecções mistas por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., totalizando 15% (3/20) dos animais estudados.

A técnica imunocromatográfica tem sido utilizada com frequência na detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti *Ehrlichia canis* e anti *Anaplasma phagocytophilum* em caninos domésticos, podendo ocorrer reação cruzada com *E. ewingii* e *A. platys*, respectivamente (GREENE, 2006; BARR, 2008).

Apesar do teste utilizado não ser padronizado para canídeos silvestres, a positividade aqui encontrada para *Ehrlichia* spp é compatível com Gabriel et al.,

(2010), Paras et al., (2012) e Starkey et al., (2013) que detectaram a presença de *Ehrlichia* spp. em *Canis latrans*.

Fatores como amostragem, sensibilidade do teste utilizado (RAMOS et al., 2009), comportamento do animal e faixa etária (RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005), podem interferir na positividade do teste.

Vale salientar ainda que as infecções por rickettsias as vezes são subclínicas, o que denota que a presença de animais sororreagentes indica a circulação destes agentes na população estudada (GREENE, 2006).

No diagnóstico molecular através de PCR convencional utilizando-se os *primers* BAB1 e BAB4, conforme protocolo de Duarte et al. (2008), não ocorreu a amplificação de DNA de *B. canis vogeli*, nas amostras analisadas, assim como descrito por Birkenheuer (2010) e Almeida (2011).

A PCR, embora seja uma técnica bastante sensível e específica, nos casos de babesiose ela é considerada de baixa sensibilidade em cães infectados naturalmente, assintomáticos ou na fase crônica da doença (BOOZER et al., 2003), que pode ocorrer devido a parasitemia baixa ou transitória.

Amplificação de DNA de *E. canis* e *A. platys* foram evidenciados em 45% (9/20) e 5% (1/20) das amostras analisadas respectivamente através do nPCR (Figuras 1 e 2).

A detecção de *E. canis*, através do nPCR corrobora com o achados de Almeida (2011) e André et al. (2012) que detectaram DNA da bactéria através da nPCR e PCR convencional, respectivamente.

Vale salientar que a nPCR tem apresentado alta sensibilidade e especificidade na detecção de *E. canis*, em cães domésticos, o que torna esta metodologia útil na avaliação dos animais (WEN et al., 1997).

Por outro lado, a amplificação de *A. platys* aqui relatada esta em desacordo dos achados de Pusterla et al. (2000) que detectaram DNA de *A. phagocytophilum* em *C. latrans* e André et al. (2012) que identificaram DNA de *Anaplasma* spp. em *S. venaticus*.

A razão para esta discordância pode ser em função da técnica utilizada para detecção das diferentes espécies de *Anaplasma*, já que a PCR convencional se

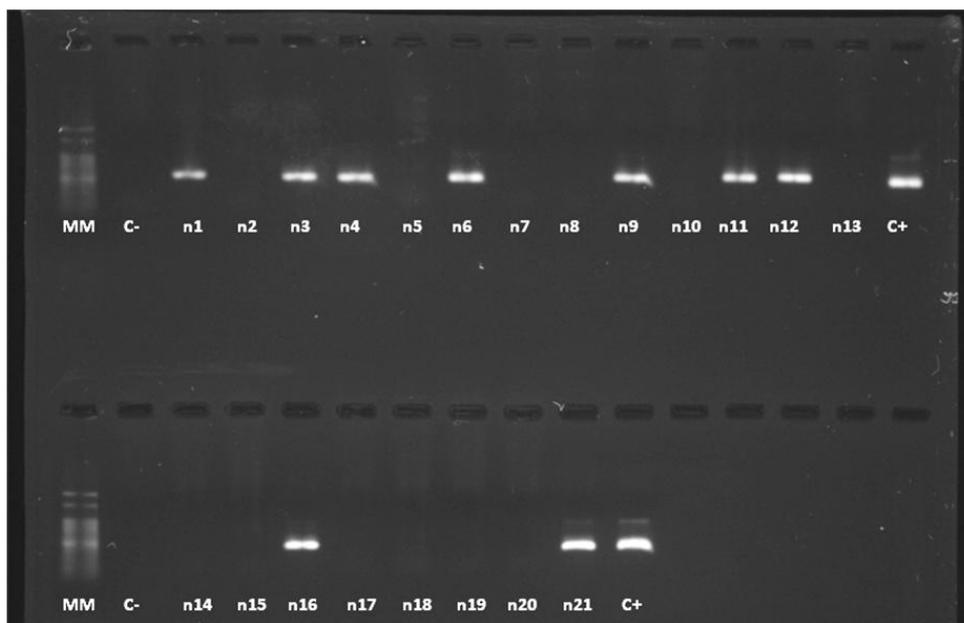


Figura 1. Gel de agarose 1% corado com *blue green* sob luz ultravioleta. Nested PCR para *Ehrlichia canis* primers HE3 e ECAN5. 389 pb. Amostras de sangue de *Cerdocyon thous* onde as amostras n1, n3, n4, n6, n9, n11, n12, n16 e n21 amplificaram. MM = marcador molecular; C- = controle negativo; C+ = controle positivo.

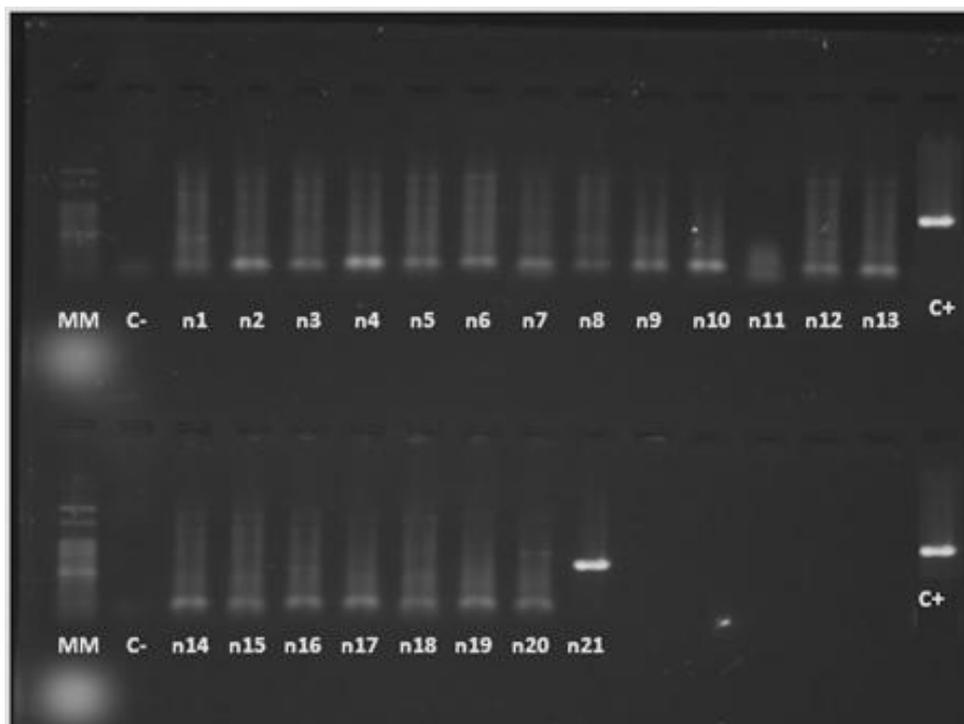


Figura 2. Gel de agarose 1% corado com *blue green* sob luz ultravioleta. Nested PCR para *Anaplasma platys* primers PLATYS-F e EHR16S-R. 678 pb. Amostras de sangue de *Cerdocyon thous* onde a amostra n 21 amplificou. MM = marcador molecular; C- = controle negativo; C+ = controle positivo.

revelou inadequada para amplificação de variantes das espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em carnívoros silvestres no Brasil (ANDRÉ et al., 2012).

Sendo assim, este é o primeiro relato da amplificação de *A. platys* em *C. thous*.

Os resultados obtidos dos hemogramas e bioquímica sérica encontram-se anexo.

A diminuição dos glóbulos vermelhos foram evidenciadas em 42.85% (3/7) dos animais examinados, particularmente pela baixa de hemoglobina e volume globular quando comparado com caninos domésticos.

Estes resultados diferem de outros estudos realizados em *C. thous* (MATTOSO et al., 2012), *Canis lupus baileyi* (DRAG, 1991), *C. lupus*, *Lycaon pictus* e *Hyaena hyaena* (POSPÍŠIL et al., 2003), assim como em cães domésticos onde a concentração de hemoglobina, volume globular e número de glóbulos vermelhos sempre apresentaram valores superiores, os quais chamam a atenção para a necessidade do estabelecimento dos valores para cada espécie de canídeo silvestre (MATTOSO et al., 2012).

Apesar do *C. thous* ser um animal generalista, com hábitos oportunistas, alimentando-se de frutos, insetos, crustáceos, pequenos invertebrados e vertebrados, ovos de diversas espécies e até mesmo de carcaças de animais domésticos e silvestres (FARIA-CORRÊA et al., 2009; BEISIEGEL et al., 2013), a anemia aqui observada pode ser explicada principalmente em função da dieta alimentar dos animais estudados (COLES, 1984; KERR, 2003; ORSINI e BONDA, 2006; TAVARES, 2014).

Não obstante a infecção por *E. canis* e *A. platys*, podem comprometer a eritropoiese, ocasionando a sua redução, e conseqüentemente a anemia (MEYER, COLES E RICH, 1995; TAVARES, 2014), como foi detectado no presente estudo a frequência de 15% dos animais sororreagentes.

Embora deve-se ter em mente que a eritrocitose aqui observada em 42.85% (3/7) pode também estar relacionada com contração esplênica em decorrência da excitação, apreensão ou medo (DUNCAN e PRASSE, 1982; COLES, 1984; MEYER, COLES E RICH, 1995; KERR, 2003), durante a contenção física e química.

Com relação às células brancas, foi observada a leucocitose em 28,57% (2/7), particularmente a linfocitose absoluta (57,14%) e a monocitose (42.85%) dos

animais que pode também estar relacionada ao estresse da captura, onde as células brancas que estavam no reservatório marginal migraram para a circulação sanguínea ocasionando um aumento discreto, sem significância clínica, como observado em cães domésticos (DUNCAN e PRASSE, 1982; COLES, 1984; MEYER, COLES E RICH, 1995; KERR, 2003).

Não obstante, doenças crônicas, assim como resposta imunológica à antígenos bacterianos são possíveis causas também para alteração dos valores absolutos de linfócitos e monócitos (COLES, 1984).

A eosinofilia apresentada em 28,57% (2/7) dos animais avaliados sugere, quando comparada com cães domésticos, estar relacionada com a presença de helmintose gastrointestinal, mesmo na ausência do diagnóstico coproparasitológico (COLES, 1984; MEYER, COLES E RICH, 1995; KERR, 2003).

No que concerne ao número de plaquetas, 57,14% (4/7) dos animais apresentaram trombocitopenia quando comparado com caninos domésticos (COLES, 1984).

Entre as razões para diminuição de trombócitos em caninos domésticos, a infecção por hematozoários, particularmente *E. canis*, tem sido apontadas como a principal causa para esta alteração celular (DAGNONE et al., 2001; ALMOSNY, 2002; SILVA et al., 2011; ALLISON e LITTLE, 2013).

Vale salientar que no animal sororreagente para *E. canis* e com amplificação do DNA através da nPCR, os valores de plaquetas apresentavam-se mais baixo quando comparado aos demais que apresentavam trombocitopenia. Esses achados são concordantes com Almosny (2002) que detectou tais alterações em caninos domésticos.

A hiperproteinemia plasmática total ocorre em 85,71% (6/7) dos animais examinados ao se comparar com os valores de referência com os de cães domésticos (COLES, 1984).

Segundo Kerr (2003), este tipo de alteração é causada em sua maioria por desidratação, processos inflamatórios, choque e alguns tipos de neoplasias, como linfossarcoma e plasmocitoma, os quais não foram avaliados no presente trabalho.

Na avaliação da bioquímica sérica, os resultados de proteína total e albumina, revelaram que 42,9% dos animais (3/7) apresentam valores abaixo da referência adotada (GOMES, 2006).

Segundo Duncan e Prasse (1982) e Kerr (2003), má nutrição assim como dietas hipoprotéicas são as principais causas da diminuição de albumina e proteína total em cães domésticos.

Quando foi realizada a avaliação da função renal, a uréia encontrou-se dentro dos valores estabelecidos por Gomes (2006). Por outro lado em 42,9% (3/7) dos animais apresentaram aumento nos valores de creatinina, os quais se forem comparados com a referência de cães domésticos, segundo Kaneko et al. (1997), encontram-se dentro da normalidade.

No que concerne às enzimas hepáticas, valores de AST encontraram-se também dentro da normalidade (Gomes, 2006), mas a enzima ALT apresentou-se aumentada em 57,1% (4/7) dos animais corroborando com os achados de Mattoso (2012).

O aumento da enzima ALT sérica em cães domésticos pode ser causada por hipóxia, toxinas ou inflamação, as quais alteram a permeabilidade da membrana do hepatócito causando esta alteração enzimática, segundo Duncan e Prasse (1982) e Meyer, Coles e Rich (1995).

Se compararmos os valores de ALT encontrados com os valores de referência em caninos domésticos (Kaneko et al., 1997), esta porcentagem estaria aumentada em apenas 14,3% (1/7) dos animais.

Apesar da fosfatase alcalina apresentar valores dentro da normalidade quando comparados a Kaneko et al. (1997), a GGT estava diminuída em 28,6% (2/7).

Os valores de cálcio sérico se mostraram diminuídos em 100% dos animais quando comparados aos valores de caninos domésticos (KANEKO et al., 1997). Este resultado é de grande valia para estabelecer valor de referência para a dosagem de cálcio sérico na espécie *C. thous*.

A hiperfosfatemia foi observada em 28,6% (2/7) dos animais estudados e 14,3% (1/7) apresentaram diminuição da dosagem (KANEKO et al., 1997)

Apesar do presente trabalho não ter investigado alterações hormonais, o aumento do fósforo assim como a diminuição do cálcio sérico, enfatizam a importância do estabelecimento de valores de referências próprios da espécie estuda.

5. CONCLUSÕES

As alterações hematológicas associadas ou não a titulação de anticorpos anti *E. canis*, assim como a presença do agente, através de infecção natural, no organismo de *C. thous* sugerem a necessidade de acompanhamento e investigação clínica na determinação deste canídeo silvestre como susceptível, além de seu papel como reservatório.

Este é o primeiro relato de detecção de anticorpos IGG anti *Ehrlichia* spp e IGG anti *Anaplasma* spp em *C. thous* no estado de Pernambuco.

Este é o primeiro relato de detecção de DNA de *A. platys* em *C. thous*.

6. REFERÊNCIAS

ACHA. P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales**, Washington: Organization Panamericana de la Salud. 2.ed., 1986.

ALLISON, R. W.; LITTLE, S. E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 2, n. 42, p. 127-144, 2013.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Leishmania em Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**, São Paulo: Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2011.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como Zoonoses**, Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, cap. 1. p. 14-56, 2002.

AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Red and gray foxes – potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 9, p. 47-50, 1973.

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular detection of tick-borne bacterial agents In Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3. p. 247-253. 2012.

ARRAGA-ALVARADO, C., et al., *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: na ultrastructural study of experimental and natural infections. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 149-156, 2003.

BARR, S.C. Anaplasma/ Ehrlichia: What to do with that Positive Titer. In: **Proceedings of the Atlantic Coast Veterinary Conference 2008**.

BEISIEGEL, B. M. et al. **Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Avaliação do Estado de Conservação dos Carnívoros**, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. v. 3, n. 1, p. 138-145, 2013.

BIRKENHEUER, A. J. et al. *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 179-182, 2010.

BRANDÃO, L P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose Canina – Revisão. **Clínica Veterinária**, v. 41, p. 50-59, 2002.

BREITSCHWERDT, E.B. et al. Babesiosis in the Greyhound. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.182, p.978-982, 1983.

CABELLO, J. et al. Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): High prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 448-454, 2013.

CALIC, S. B. Sorologia das Riquetsioses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 185-187, 2004. Suplemento.

CAMPANA, G. A.; OPLUSTIL, C. P.; FARO, L. B. Tendências em medicina laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 399-408, 2011.

CARDOSO, L. et al. Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 90-95, 2013.

CARRADE, D. D. et al. Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1129-1141, 2009.

CHAVES, L. A.; LEITE, R. A. C.; NAVECA, S. A. **Erlíquiose canina**, Manaus: Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais) – Qualittas Instituto de Pós-Graduação. 2007.

COLES, E. H. **Patologia Clínica Veterinária**, São Paulo: Editora Manole, 566 p., 1984.

COSTA, J. O.; SILVA, M.; BATISTA JÚNIOR, J. A.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.

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.

CURI, N. H. A.; MIRANDA I.; TALAMONI S. A. Serologic evidence of Leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.1, p. 99-101, 2006.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erlíquiose nos animais e no homem – animal and human ehrlichiosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 191-201, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 41, p. 197-2003, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the Brown dog tick. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 26, 2010.

DRAG, M. G. Hematologic values of captive Mexican wolves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 11, p. 1891-1992, 1991.

DUARTE, S. C. **Caracterização molecular e morfológica de isolados de *Babesia* em cães de Goiânia, GO, Brasil**, Goiás: Tese (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás. 2007

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

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

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 217 p., 1982.

ESTEVES, V. S. **Erliquiose e infecções relacionadas em cães**, Porto Alegre: Monografia (Especialista em Análises Clínicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 2007.

EBANI, V. V. *et al.* Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 3, p. 699-703, 2011.

EVERS, H. V. *et al.* Experimental *Babesia canis* infection in Coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 4, p. 904-908. 2003.

FAIRBROTHER, A.; O'LOUGHLIN, D. Differential white blood cell values of the mallard (*Anas platyrhynchos*) across different ages and reproductive states. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 1, p. 78-82, 1990.

FARIA-CORRÊA, M.; BALBUENO, R. A.; VIEIRA, E. M.; FREITAS, T. R. O. Activity, habitat use, density, and reproductive biology of the crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) and comparison with the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in a Restinga area in the southern Brazilian Atlantic Forest. **Mammalian Biology**, v. 74, p.220-229, 2009.

FERREIRA, R. F. *et al.* *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5, n. 3, 2007.

FLACKE, G. *et al.* A survey of internal parasites in free-ranging African wild dogs (*Lycaon pictus*) from KwaZulu-Natal, South Africa. **Short Communications. South African Journal of Wildlife Research**, v. 40, n. 2, p. 176-180, 2010.

GABRIEL, M. W. et al. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* infection in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in northwestern California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 2, p. 344–354, 2009.

GABRIEL, M. W. et al. Effectiveness of rapid diagnostic tests to assess pathogens of fishers (*Martes pennanti*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 966–970, 2010.

GOMES, M.S. Carnivora – Canidae (Lobo-guará, Cachorro-do-mato, Raposa-do-campo) In: CUBAS, Z.C.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – medicina veterinária**, São Paulo: ROCA, cap. 30, p.492-504, 2006.

GREENE, C. E. Infectious diseases of The Dog and Cat. **St. Louis: Saunders**, cap. 28, p. 203-232, 2006.

GUIMARAES, A.M., OLIVEIRA, T.M.F.S., SANTA-ROSA, I.C.A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clinica Veterinária**, v. 41, p. 60-68, 2002.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997.

HAGIWARA, M.K.; HOLZCHUH, M.P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*: Avaliação do leucograma durante a evolução da doença. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.39, p.745–755, 1987.

HOEHNE, L.; ROSENFELD, G. Dados hematológicos do Cachorro do mato (*Cerdocyon thous azarae*). Estudos de hematologia comparada II. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 25, n. 2, p.55-57, 1953.

IRWIN, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, suplemento 4, 2009.

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, San Diego: Academic Press, 932p. 1997.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária – bioquímica clínica e hematologia**, São Paulo: Editora Roca, 2ª edição. 436 p., 2003.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães do Brasil. **Clinica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

LAURENSEN, K.; SILLERO-ZUBIRI, C.; THOMPSON, H.; SHIFERAW, F.; THIRGOOD, S.; MALCOLM, J. Disease as a threat to endangered species: Ethiopian

wolves, domestic dogs, and canine pathogens. **Animal Conservation**, v. 1, p. 273-280, 1998.

LIMA, M. L. F. et al. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 381-385, 2010.

MACEDO, E. A. **Ultraestrutura de células parasitadas por *Ehrlichia* spp., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região deUberlândia-MG**, Minas Gerais: Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária. 2007.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, v. 13, 2004, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-55, 2004.

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***, São Paulo: Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2010.

MÁRQUEZ, J.; MILLAN, J. Rickettsiae in Ticks from wild and domestic carnivores of Donana National Park (Spain) and surrounding area. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 21, p. 224-226, 2009.

MARTIN, A. R. et al. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 109, p. 176-180, 2005.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MATIJA, P. T. et al. Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 123–127, 2008.

MATTOSO, C. R. S. et al. Hematologic, serum biochemistry and urinary values for captive *Crab-eating Fox* (*Cerdocyon thous*) in São Paulo state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 559-566, 2012.

MCBRIDE, J. W. et al. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection with Recombinant Proteins. **Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 315, 2001.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R.; GAUNT, D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 441-447, 1996.

MCQUISTON, J. H.; MCCALL, C. L.; NICHOLSON, W. L. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Medicine Today: Zoonosis Update, JAVMA**, v. 223, n. 12, p. 1750-1756, 2003.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária – Interpretação e Diagnóstico**, São Paulo. Editora Roca LTDA. 308p. 2003.

MORALES, D. B. **Determinación de la presencia de anticuerpos circulantes contra *Ehrlichia canis* en perros con historia de garrapatozis atendidos em una clinica veterinaria Del município de Fraijanes, Guatemala, en el período comprendido entre diciembre 2011 – febrero 2012**, Guatemala: Trabalho de graduação (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2013.

OLICHESKI, O. 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**, Porto Alegre: Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 2003.

OLIVEIRA, F. C. G. **Avaliação preliminar de impacto ambiental sobre a fauna de pequenos mamíferos e suas taxas de infecção por *Trypanosoma cruzi* e hantavírus na área de influência da usina hidrelétrica Espora, Aporé – GO, Goiás**: Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Universidade Católica de Goiás. 2008.

ORSINI, H.; BONDAN, E. F. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas implicações no comportamento e bem-estar animal – revisão da literatura. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 24, p. 7-13, 2006.

PAINE, R. An observation on the preparation of blood smears for the diagnosis of piroplasmiasis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 5, p.127, 1934.

PARAS. K. L. et al. Detection of *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia* species in Coyotes (*Canis latrans*), from Rural Oklahoma and Texas. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n.7, p. 619:621, 2012.

PASSOS, L. M. F.; GEIGERB S. M.; RIBEIRO M. F. B.; PFISTERB, K.; ZAHLERRINDERB, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.

PUSTERLA, N. et al. Serological evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1168-1169, 1999.

PUSTERLA, N. et al. Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in Coyotes in California. **Journal of wildlife diseases**, v. 36, n. 3, 2000.

RABELO, F. A. Doenças transmitidas por vetores em canídeos na região da serra do Amolar, Pantanal, Brasil. Mato Grosso do Sul: Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2014.

RAMOS, C. A. N. et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, suplemento 1, 2009.

REIS, V. M. **Pesquisa de Rickettsia sp. e Ehrlichia spp. em canídeos e felídeos selvagens de vida livre e cães domésticos da região do Parque Nacional das Emas, Goiás**, Goiás: Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2012.

RIKIHISA, Y. New findings on members of the family Anaplasmataceae of Veterinary importance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 438-445, 2006.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 75-79, 2005.

SANTARÉM, V. A., LAPOS, C. B., FARIAS, M. R. Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 2, p. 60-66, 2005.

SANTOS, J. L. C. **Parasitas de canídeos domésticos e silvestres da região do Parque Nacional da Serra do Cipó – Minas Gerais, Brasil**, Minas Gerais: Dissertação (Mestre em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. **Veterinary hematology**. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p. 453-458, 1975.

SILVA, J. C. R. Zoonoses e doenças emergentes transmitidas por animais silvestres. **Portal Educação**, Campo Grande, MS. 1 jan. 2008. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br/veterinaria/artigos/2463/zoonoses-e-doencas-emergentes-transmitidas-por-animais-silvestres>>. Acesso 12 out. 2014.

SILVA, M. V. M. et al. Erliquiose canina: revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n.2, p. 139-143, 2011.

SILVA, R. A. M. S., LIMA, E. S. de S., SANCHES, V. Estudos preliminares sobre os valores hematológicos do lobinho (*Cerdocyon thous*) do Pantanal, MS. **Embrapa. Circular Técnica**, v. 56, 2004

STARKEY, L. A. et al. Prevalence of antibodies to Spotted Fever Group *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. in Coyotes (*Canis latrans*) in Oklahoma and Texas, USA. **Journal of Wildlife Disease**, v. 49, n. 3, p. 670-673, 2013.

SOARES, J. F. et al. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalli* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 156-163, 2014.

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

SUKSAWAT, J, PITULLE, C, ARAGA-ALVARADO, A, et al. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 93, p. 90–93, 2001.

SUKSAWAT, J, PITULLE, C, ARAGA-ALVARADO, A, et al. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. Author's correction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3887, 2002.

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In.: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Missouri: Saunders Elsevier, cap. 77, p. 722-736, 2006.

TAVARES, H. L. Alimentação e nutrição de animais silvestres. **XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia**. Universidade Federal do Espírito Santo. 2014.

TORINA, A. et al. A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in Foxes and Fleas from Sicily. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 60, suplemento 2, p. 125-130, 2013.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. Risk Factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 356, p. 983-989, 2001.

TRAPP, S. M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 223-230, 2006.

VASCONCELOS, M. F. **Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal**, Brasília: Dissertação (Mestre em Saúde Animal) – Universidade de Brasília. 2010.

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

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p. 1852-1855. 1997.

WIDMER, C. E.; AZEVEDO, F. C.C.; ALMEIDA, A. P.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Tick-Borne bacteria in free-living jaguars in Pantanal, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 1001-1005, 2011.

WILLIAMS, B. M. et al. Prevalence and diversity of Babesia, Hepatozoon, Ehrlichia, and Bartonella in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. **Parasitology Research**, v. 113, p. 911-918, 2014.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, p.75-98, 1991.

7. ANEXO

Protocolo para Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 microlitros de sangue utilizando-se kit Comercial da Qiagen®, Tissue & Blood Qiamp (250)®, conforme recomendações do fabricante.

Protocolo de Nested PCR para *Ehrlichia canis*

Para *Ehrlichia canis* uma nested-PCR foi realizada utilizando-se na primeira reação os primers ECC: 5' AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC 3' e ECB: 5' CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 3', que delimitam um fragmento de 478pb do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. A primeira reação foi feita em volume de 25uL contendo 0,5 pmol de cada primer, 1,5U de Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTPs, 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50µM KCl, 1,5mM de MgCl₂ e 3uL de DNA. A amplificação foi realizada utilizando-se 94° por 1 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 40 seg.

Na segunda reação foram utilizados os primers HE-3: 5' TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT 3' e ECAN5: 5' CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA 3' que delimitam um fragmento de 389pb do gene 16S rRNA apenas de *E. canis*. A reação e amplificação foram feitas conforme descrito anteriormente (primeira reação), modificando-se apenas a concentração de cada primer para 2,0 pmol. Para cada reação foram utilizados como controle positivo DNA de cão naturalmente infectado com *E. canis* e como controle negativo, material biológico de cão livre do parasito.

Protocolo de Nested PCR para *Anaplasma platys*

Para *Anaplasma platys* uma nested-PCR foi realizada utilizando-se na primeira reação os primers 8F: 5'AGTTTGATCATGGCTCAG 3' e 1448R: 5' CCATGGCGTGACGGGCAGTGT 3', que delimitam o gene 16S rRNA de *Anaplasma platys*. A primeira reação foi feita em volume de 25uL contendo 0,5 pmol de cada primer, 1,5U de Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTPs, 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50µM KCl, 1,5mM de MgCl₂ e 3uL de DNA. A amplificação foi realizada

utilizando-se 94° por 1 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 1 min e extensão a 72°C por 40 seg.

Na segunda reação foram utilizados os primers PLATYS-F: 5' GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG 3' e EHR16S-R: 5' TAGCACTCATCGTTTACAGC 3' que delimitam um fragmento de 678pb do gene 16S rRNA apenas de *A. platys*. A segunda reação foi feita 94° por 1 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 3 min. Para cada reação foram utilizados como controle positivo DNA de cão naturalmente infectado com *A.platys* e como controle negativo, material biológico de cão livre do parasito.

Protocolo de PCR convencional para *Babesia canis vogeli*

Para *Babesia canis vogeli* uma PCR convencional foi realizada utilizando-se os primers BAB1: 5' GTGAACCTTATCACTTAAAGG 3' e BAB4: 5' CAACTCCTCCACGCAATCG 3', que delimitam um fragmento de 590pb do gene 18S rRNA de *B. canis vogeli*. A primeira reação foi feita em um volume de 25uL contendo 1 pmol de cada primer, 1,5U de Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTPs, 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50µM KCl, 1,5mM de MgCl₂ e 1 uL de DNA. Os seguintes parâmetros foram utilizados na PCR convencional: A amplificação foi realizada utilizando-se 94° por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 seg.

Eletroforese

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% corado com corante comercial Blue Green DNA Loading Dye (LGC)® em tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44M ácido bórico; 12,49mM EDTA).

Tabela 1. Achados hematológicos em *C. thous* provenientes de cativeiro e sua relação com achados sorológicos e moleculares

Parâmetros	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	Valor de referência
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	6,53	7,47	7,45	6,76	5,68	4,64	7,89	4,31-6,77
Hemoglobina (g/dL)	12,7	15,3	14,6	13,1	12,1	8,5	14,2	12,96-16,88
Hematócrito (%)	37	47	43	38	38	23	38	38-49
VCM (μ^3)	56,7	62,9	57,7	56,2	66,9	49,6	48,2	68-95
CHCM (%)	34,3	32,5	33,9	34,5	31,8	37	37,4	31-38
Leucócitos ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$)	9.400	8.000	11.200	8.600	14.300	8.200	14.000	8.100-13.900
Segmentados (%)	74	64	53	57	54	50	63	70-83
Segmentados ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$)	6.956	5.120	5.936	4.902	7.722	4.100	8.820	5.758-10.387
Eosinófilos (%)	05	04	11	08	25	25	09	3-12
Eosinófilos ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$)	470	320	1.232	688	3.575	2.050	1.260	189-1.336
Linfócitos (%)	16	28	35	32	17	19	26	7-18
Linfócitos ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$)	1.504	2.240	3.920	2.752	2.431	1.558	3.640	1.062-2.357
Monócitos (%)	05	04	01	03	04	06	02	0-3
Monócitos ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$)	470	320	112	258	572	492	280	0-354
Plaquetas (milhares/ mm^3)	240	270	140	300	180	120*	140	-
PPT (g/dL)	9,5	8,2	8,5	8,7	7,5	8,2	8,0	-
Sorologia <i>Ehrlichia</i> spp.	-	-	-	-	-	+	-	
Sorologia <i>Anaplasma</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	
nPCR <i>Ehrlichia canis</i>	+	-	+	+	-	+	-	
nPCR <i>Anaplasma platys</i>	-	-	-	-	-	-	-	

VCM = Volume corpuscular médio; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média
PPT = proteína plasmática total; * Presença de macroplaquetas

Tabela 2. Achados bioquímicos em *C. thous* provenientes de cativeiro.

Parâmetros	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	Valor de referência
Proteína total (g/ dL)	5,3	5,9	6,3	6,1	4,8	6,0	4,7	5,47-7,09
Albumina (g/ dL)	2,5	2,3	2,4	2,0	2,0	2,4	2,4	2,44-3,98
Uréia (mg/ dL)	23,8	47,5	49,2	70,0	39,5	32,7	38,5	22,46-71,84
Creatinina (mg/ dL)	1,3	1,0	1,1	1,3	1,0	1,3	1,0	0,37-1,11
ALT (UI/ mL)	58,3	70,2	65,8	54,0	48,4	36,5	134,1	19-54
AST (UI/ mL)	43,1	40,3	49,1	32,1	41,0	28,3	39,8	19-54
Fosfatase alcalina (UI/L)	86,8	33,2	44,8	57,2	134,9	127,1	150,1	-
GGT (U/l)	0,7	2,9	5,3	1,4	8,0	1,1	6,0	-
Cálcio (mg/dL)	7,6	6,9	7,7	9,7	8,7	9,7	8,4	-
Fósforo (mg/dL)	1,9	5,9	2,6	4,5	9,0	4,5	4,7	-

ALT = Alanina aminotransferase; AST = Aspartato aminotransferase; GGT = Gama Glutamil Transferase