



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Uso da PCR convencional como meio de diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães com trombocitopenia

Luíza Monteiro de Almeida

Areia, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Uso da PCR convencional como meio de diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães com trombocitopenia

Luíza Monteiro de Almeida

Trabalho de conclusão de curso realizado e apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba, sob orientação da professora Danila Barreiro Campos.

Areia, 2017

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

A447u Almeida, Luíza Monteiro de.
Uso da PCR convencional como meio de diagnóstico de Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia spp. e Hepatozoon spp. em cães com trombocitopenia / Luíza Monteiro de Almeida. - Areia: UFPB/CCA, 2017.
40 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientadora: Profa. Dra. Danila Barreiro Campos.

1. Hemoparasitose canina. 2. Diagnóstico molecular. 3. Plaqueta. I. Campos, Danila Barreiro (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 619:636.7

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luíza Monteiro de Almeida

Uso da PCR convencional como meio de diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães com trombocitopenia

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em: 26 de julho de 2017

Nota: 10,0 (Dez)

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Danila Barreiro Campos – UFPB

Prof.^a Dr.^a Ivia Carmem Talieri - UFPB

Msc. Rafael Lima de Oliveira

Prof. Oliveiro Caetano de Freitas Neto
Coordenação de TCC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em memória da minha avó Adenice Monteiro, por toda ajuda e apoio dados durante sua vida para que eu alcançasse meu sonho. Sei da felicidade que teria em participar desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Augusto e Martha, a quem devo toda minha vida, por terem me apoiado e incentivado incondicionalmente até nos momentos de cansaço e desânimo. Obrigada por se preocuparem tanto comigo, por permitirem que eu estudasse em outra cidade, mesmo com tantos desafios, e por viabilizarem todo meu crescimento.

Ao meu irmão Eduardo, por ter me acompanhado tantas vezes até que eu pudesse viajar sozinha, por sempre me incentivar e acreditar em mim.

Aos meus tios Anginha, Elenice, Estelita e Barão, pelo incentivo, apoio e estímulo para enfrentar todas as barreiras da vida. Obrigada por tantas vezes terem trazido minha avó (*in memoriam*) para me visitar quando eu não podia voltar para casa.

Agradeço à minha prima Anna Lima, por me falar com tanta paixão da Medicina Veterinária e me apoiar desde cedo na minha escolha. E sua mãe, minha tia Marta, que como ela diz, também é médica veterinária, pelo incentivo.

Aos meus primos que torceram a todo instante por esse momento.

À minha Avó Adenice (*in memoriam*), a quem eu terei saudades eternas, por sempre apoiar meus estudos, se preocupar com minha formatura, por querer tanto quanto eu esta conquista.

A todos da Família Monteiro e Barbosa, pelo carinho que sempre tiveram e por sempre me ajudarem em qualquer coisa que eu precisasse.

A todos da Família Almeida, que mesmo na distância me incentivaram e torceram para eu chegar até aqui.

Ao meu namorado Luan, por seu amor, compreensão e apoio durante esta etapa final, mesmo quando me perguntava se eu não poderia ter escolhido um tema mais fácil.

À minha querida orientadora Danila, que acolheu a mim e a meus pais, antes mesmo do meu ingresso a UFPB, para tratarmos de adaptações e acessibilidade que teriam que ser feitas no campus. Obrigada por todo apoio durante o curso, por acreditar, se preocupar e me ajudar. Agradeço por todo conhecimento compartilhado, pela confiança no laboratório e por acreditar neste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, obrigada por todo ensinamento e paciência, por sempre acreditarem em mim, viabilizarem as aulas práticas e compartilharem bons momentos.

À Magda, por sua amizade, companheirismo e parceria no curso e na pesquisa. Por toda nossa história, tínhamos que encerrar nossos trabalhos juntas mesmo.

Aos meus amigos Juliany, Alexandra, Ricardo, Tony, Augusto, Rodrigo, por toda amizade compartilhada, pelas aventuras, passeios, festas, pelas noites viradas por conta dos estudos, por alegrarem meus dias e por me incentivarem. Sem ajuda de vocês eu não teria conseguido. Aproveito para agradecer a todos da turma 2012.1 e a Paulo, pela amizade gratuita e todos os momentos que estive disposto a me ajudar.

Agradeço à Conceição Gonçalves, pela contribuição imensa no desenvolvimento da pesquisa, sempre na torcida para que desse certo e disposta a ajudar quando precisava.

Agradeço à UFPB e todos servidores que contribuíram na minha formação. À professora Fabiana, responsável pelo Laboratório de Patologia Clínica, por fornecer as amostras para a realização do trabalho, agradeço também à Tereza, técnica do laboratório pelas orientações e conselhos sobre o trabalho. Aos professores Celso, Patrícia e Paulo, responsáveis pelo LAPOA, que cederam espaço quando precisamos, pelos ensinamentos, instruções e torcida.

Aos meus amigos Gabriela, Victória, Matthews, Josemir, Rafael e Emanuel, por todos anos de companheirismo, por compreenderem minha ausência, e nunca deixarem que a distância atrapalhasse nossa amizade.

Aos meus peludos Pietra e Thingy (*in memoriam*), por me darem amor puro e verdadeiro e por muitas vezes serem inspiração para os meus estudos.

Obrigada tio Augusto e tia Manã, por toda ajuda e torcida pelo meu sucesso.

À Ana Berenice, pelo apoio e carinho.

A todas pessoas não mencionadas, mas que em algum momento me ajudaram, meu muito obrigada.

Por fim, agradeço a Deus, pela vida de todas essas pessoas, que junto a mim caminharam até o dia de hoje e fizeram parte dessa conquista.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	Trombocitopenia	13
1.2	Erliquiose canina.....	14
1.3	Anaplasnose canina	17
1.4	Babesiose canina.....	18
1.5	Hepatozoonose canina	20
1.6	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	21
1.7	Objetivos.....	22
2	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1	Amostras.....	23
2.2	Extração de DNA	23
2.3	PCR (reação em cadeia de polimerase).....	23
2.3.1	Primers.....	23
2.3.2	PCR.....	24
2.4	Análise dos dados.....	25
2.5	Aspectos éticos	25
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
4	CONCLUSÕES.....	33
	REFERÊNCIAS	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Percentual dos hemoparasitas nos resultados obtidos no exame da PCR em amostras sanguíneas de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.26

FIGURA 2. Percentual de amostras sanguíneas com infecções simples, infectadas por dois parasitas e infectadas por três parasitas, de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Lista de *primers* utilizados nas reações para cada gene pesquisados.24

TABELA 2. Resultado da PCR de hemoparasitas em amostras sanguíneas de cães trombocitopênicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.28

TABELA 3. Relação das classificações das solicitações de exames de microscopia comparados com os resultados da PCR para identificação de hemoparasitas em amostras sanguíneas de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.29

TABELA 4. Tabela comparativa entre os resultados do exame de pesquisa direta de hemoparasitas e os resultados da PCR para cada agente infeccioso diagnosticado em amostras sanguíneas de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.31

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
B	<i>Babesia</i> spp
<i>B. canis canis</i>	<i>Babesia canis canis</i>
<i>B. canis rossi</i>	<i>Babesia canis rossi</i>
<i>B. canis vogeli</i>	<i>Babesia canis vogeli</i>
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
dATP	desoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	desoxiGuanosina Trifosfatada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dTTP	desoxiTimidina Trifosfatada
E	<i>Ehrlichia canis</i>
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
EB	<i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> spp.
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EMC	Erliquiose Monocítica Canina
H	<i>Hepatozoon</i> spp
<i>H. canis</i>	<i>Hepatozoon canis</i>
HA	<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>A. platys</i>
HB	<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Babesia</i> spp
HBA	<i>Hepatozoon</i> spp, <i>Babesia</i> spp., e <i>A. platys</i>
HE	<i>Hepatozoon</i> spp e <i>E. canis</i>
HEA	<i>Hepatozoon</i> spp, <i>E. canis</i> , e <i>A. platys</i>
HEB	<i>Hepatozoon</i> spp., <i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> spp
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	potencial Hidrogênico
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
μm	Micrometro
mg/kg	Miligramas por Quilogramas
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{ng}/\mu\text{l}$	Nanogramas por Microlitros
μM	Micromolar
1X	Uma vez
mM	Milimolar
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
U	Unidades
H_2O	Água
%	Percentual / Porcentagem
Nº	Número
Ng	Nanogramas
\pm	Mais ou menos

RESUMO

ALMEIDA, Luíza Monteiro de, Universidade Federal da Paraíba, julho de 2017. **Uso da PCR convencional como meio de diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães com trombocitopenia.** Orientadora: Danila Barreiro Campos.

No Brasil, as hemoparasitoses mais comuns na clínica de pequenos animais são *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, e *Anaplasma platys*. São doenças frequentemente associadas à trombocitopenia e a PCR é uma técnica com alta especificidade e sensibilidade para detecção dessas hemoparasitoses. Os objetivos deste trabalho foram, com uso da PCR, identificar os hemoparasitas (*E. canis*, *A. platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp.) em cães com trombocitopenia, detectar coinfeções destes agentes e comparar os resultados com os diagnósticos feitos pela pesquisa direta em estirado sanguíneo. Foram selecionadas 88 amostras de sangue de cães que apresentavam trombocitopenia e, após extração do DNA foram realizadas as PCRs para detecção dos hemoparasitas. O *Hepatozoon* spp. foi detectado em 63 (72%) das amostras, *Babesia* spp. em 39 (44%), *E. canis* em 25 (28%) e *A. platys* em 13 (15%). Do total, 32 (36%) foram positivas para apenas um agente, 30 (34%) para dois parasitas e 16 (18%) para três microrganismos. Dos resultados positivos no exame de microscopia para *E. canis*, 5 (35,7%) foram confirmados e 9 (64,3%) não confirmados na PCR. Para *A. platys*, 1 (25%) foi confirmado e 3 (75%) não confirmados. A *Babesia* spp foi confirmada em 5 (71,4%) e não confirmada em 2 (28,6%). O *Hepatozoon* spp foi confirmado em 5 (83,3%) e não confirmado em 1(16,7%) amostra. Conclui-se que há alta prevalência de hemoparasitoses caninas em animais trombocitopênicos, sendo comum a ocorrência de coinfeções. Há alto índice de infecção por *Hepatozoon* spp. em cães trombocitopênicos atendidos no hospital veterinário da UFPB. A PCR mostrou-se mais sensível e específica no diagnóstico de hemoparasitas quando comparada ao exame parasitológico direto em sangue periférico.

Palavras-chaves: Plaqueta, hemoparasitose canina, diagnóstico molecular

ABSTRACT

ALMEIDA, Luíza Monteiro de, Universidade Federal da Paraíba, July 2017. **Use of conventional PCR for the diagnostic of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs with thrombocytopenia.** Advisor: Danila Barreiro Campos

In Brazil, the most common hemoparasites in the clinic of small animals are *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, and *Anaplasma platys*. These diseases are often associated with thrombocytopenia and PCR is a technique with high specificity and sensitivity for the detection of these hemoparasites. The objective of this work was to identify hemoparasites (*E. canis*, *A. platys*, *Babesia* spp. And *Hepatozoon* spp.) in dogs with thrombocytopenia, to detect co-infections of these agents and to compare the results with the diagnosis made by direct research into blood draw. Blood samples (88) from dogs that presented thrombocytopenia were selected and, after DNA extraction, PCRs was performed to detect hemoparasites. *Hepatozoon* spp. was detected in 63 (72%) of the samples, *Babesia* spp. in 39 (44%), *E. canis* in 25 (28%) and *A. platys* in 13 (15%). Of the total, 32 (36%) samples were positive for only one agent, 30 (34%) for two parasites and 16 (18%) for three microorganisms. Positive results in the microscopy examination for *E. canis* were confirmed in 5 (35.7%) animals, and in 9 (64.3%) results were not confirmed in the PCR. For *A. platys*, 1 (25%) case was confirmed and 3 (75%) were unconfirmed. *Babesia* spp. was confirmed in 5 (71.4%) animals and not confirmed in 2 (28.6%). *Hepatozoon* spp. was confirmed in 5 (83.3%) samples and not confirmed in 1 (16.7%). There is a high prevalence of canine hemoparasitosis in animals thrombocytopenic dogs, and the occurrence of coinfections is common. A high rate of infection with *Hepatozoon* spp. was observed in thrombocytopenic dogs treated at the veterinary hospital of UFPB. PCR was more sensitive and specific in the diagnosis of hemoparasites than the direct parasitological examination in peripheral blood .

Keywords: Platelet, canine hemoparasitosis, molecular diagnostic

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As hemoparasitoses são frequentes na clínica médica de pequenos animais e provocam doenças de sintomatologias semelhantes, porém inespecíficas (FIGUEIREDO, 2011). As chamadas “doenças do carrapato” são causadas por bactérias ou protozoários transmitidos, principalmente, pelo *Rhipicephalus sanguineus*. Tais agentes são responsáveis pelo aparecimento de anemia, leucopenia e trombocitopenia, condições graves que podem levar o animal a óbito (LABARTHE *et al.*, 2003; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Os hemoparasitas mais comuns no Brasil atualmente são *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, e *Anaplasma platys* (SALGADO, 2006; COSTA, 2011)

As plaquetas fazem parte do conjunto de componentes responsáveis pela hemostasia efetiva, além delas, existem também, os fatores de coagulação e a parede vascular que atuam nesse processo de controle do sangramento e manutenção do fluxo sanguíneo. São fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos em formato de disco plano (BAKER, 2015). Uma das primeiras formas de avaliação da hemostasia é a contagem de plaquetas, que nos cães pode variar de 200.000 a 500.000 plaquetas/ μ l (JAIN, 1993). Desta forma, quando a contagem de plaquetas é inferior ao valor mínimo de referência é dito que o animal apresenta um estado patológico, chamado trombocitopenia (TAKAHIRA; MATTOSO, 2015).

1.1 Trombocitopenia

A trombocitopenia é uma das principais causas de hemorragias em pequenos animais. Nestes casos são comuns sangramentos mucocutâneos puntiformes, denominados petéquias. Em casos mais graves, o extravasamento sanguíneo apresenta uma extensão maior gerando equimoses, hematomas e ainda epistaxe (REBAR *et al.*, 2003).

As causas da trombocitopenia são as mais variadas, podendo ser em razão da redução da produção, do aumento do consumo, da maior destruição, da redistribuição de plaquetas e da pseudotrombocitopenia. A trombocitopenia por redistribuição é devido ao sequestro esplênico, já a pseudotrombocitopenia é causada por agregação plaquetária consequente da punção venosa difícil ou quantidade insuficiente de anticoagulante (TAKAHIRA; MATTOSO, 2015). A diminuição da produção de plaquetas pode ser por consequência da hipoplasia de medula e suas causas são variadas: por irradiação corporal total, medicamentos, toxinas, agentes infecciosos e neoplasias (BAKER, 2015). Os distúrbios que causam maior consumo são os associados à vasculite ou à coagulação intravascular disseminada (CID), porém estes apresentam uma trombocitopenia de intensidade variada (TAKAHIRA;

MATTOSO, 2015). Em animais saudáveis, existe um equilíbrio entre a produção e a destruição plaquetária. Em média, as plaquetas ficam na circulação sanguínea por 5 a 9 dias e, à medida que envelhecem, são removidas por macrófagos no baço e fígado. O aumento da destruição acontece com mais frequência por mecanismos imunomediados de causas idiopáticas ou associados a agentes infecciosos, neoplasia, drogas, doenças autoimunes ou transtornos neonatais (FELDMAN *et al.*, 2000). É comum a combinação de duas ou mais causas, entretanto, as mais comuns são a diminuição da produção e a destruição imunomediada, que juntas provocam as trombocitopenias mais intensas (STOCKHAM; SCOTT, 2008).

A principal causa infecciosa de trombocitopenia em cães é a infecção por *Ehrlichia canis* e menos comumente por *Anaplasma platys*. Estudos apontam que a erliquiose em seu estágio inicial causa destruição de plaquetas por mecanismos imunomediados, e no final da doença provoca a aplasia de medula óssea e por consequência a diminuição na produção de plaquetas (BAKER, 2015). Há relatos que a *Babesia* spp. também induza trombocitopenia, contudo as causas não estão elucidadas completamente (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006), os mecanismos mais prováveis são destruição mediada por anticorpos, associada ao aumento do consumo de plaquetas devido à vasculite endotelial e sequestro esplênico (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002). A trombocitopenia é um achado laboratorial presente em animais infectados por *Hepatozoon* spp. porém esta alteração geralmente é atribuída a presença de outra infecção concomitante, e não exclusivamente ao *Hepatozoon* spp. (MUNDIM *et al.*, 2008).

1.2 Erliquiose canina

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é causada pela bactéria da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia*, espécie *Ehrlichia canis*. A prevalência de infecção por *E. canis* é alta em regiões tropicais e subtropicais e está distribuída em todos os continentes com exceção da Austrália. Há alguns relatos de casos de erliquiose monocítica humana sendo a *E. canis* o agente etiológico (MCVEY *et al.*, 2016).

O carrapato se infecta durante o repasto sanguíneo ao parasitar um animal contaminado, e transmite a infecção ao se alimentar de outro animal, no qual inocula o agente (MCDADE, 1990). O período de incubação da *E. canis* é de 8 a 20 dias após a inoculação pelo carrapato. A intensidade da doença varia de acordo com sua fase (aguda, subclínica e

crônica). É difícil determinar qual a fase clínica que o animal infectado se encontra, visto que os sinais clínicos e laboratoriais são semelhantes durante todas as fases (AGUIAR, 2015).

Uma vez na corrente sanguínea, a *E. canis* penetra nos monócitos como corpúsculos de aproximadamente 0,2 a 0,6 µm de diâmetro, impede a ligação dos endossomos aos lisossomos, como mecanismo de defesa, e se multiplica em dois estágios, os corpúsculos iniciais e as mórulas. Dentro das células, circula pelo organismo, concentrando-se em órgãos do sistema mononuclear fagocítico: baço, linfonodos e fígado, ocasionando linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia por hiperplasia linforreticular. O patógeno promove ainda interação com as células do endotélio vascular, causando vasculite, desordens imunológicas e inflamatórias que suprimem a atividade microbicida de macrófagos, causam hemaglutinação, infiltração leucocitária em diversos órgãos como rins, baço, fígado, olhos, além de iniciar a produção de anticorpos antiplaquetários (FELDMAN *et al.*, 2000; AGUIAR, 2015; MCVEY *et al.*, 2016). A evolução da doença leva à aplasia de medula, diminuindo a produção de hemácias e plaquetas, conseqüentemente, gerando anemia não regenerativa, normocítica e normocrômica, acompanhada de leucopenia e trombocitopenia (BAKER, 2015).

A fase aguda da doença dura em média duas a quatro semanas, o animal infectado apresenta febre, anorexia, depressão e no exame laboratorial, trombocitopenia. É durante esta fase que é possível encontrar maior parasitismo e identificar mórulas nos monócitos pelo exame de esfregaço sanguíneo. Acontece anemia normocítica normocrômica regenerativa por conta da vasculite e perda sanguínea (FELDMAN *et al.*, 2000; MENDONÇA *et al.*, 2005). Na fase subclínica o animal parece saudável, com sintomas mais leves, podendo apresentar apenas emagrecimento. Alguns animais podem permanecer infectados sem apresentar sinais clínicos e os imunocompetentes são capazes de eliminá-lo, mesmo sem tratamento. É nesta fase que se encontra alta concentração de anticorpos contra *E. canis* nos animais infectados (JAIN, 1993). A fase crônica acontece quando o sistema imune do animal não consegue debelar a infecção, nela são observadas as alterações mais graves, o animal apresenta pancitopenia, glomerulonefrite, hemorragias e aumento da suscetibilidade às infecções secundárias devido à supressão do sistema imune. A anemia passa a ser arregenerativa devido à característica autoimune que causa hipoplasia de medula. Tanto na fase aguda quanto na crônica são observadas lesões oculares como opacidade de córnea, uveíte, hemorragia conjuntival, entre outras (MENDONÇA *et al.*, 2005).

O diagnóstico pode ser clínico e laboratorial, baseado nas suspeitas pelos sintomas e alterações nos exames de hemograma, bioquímico e urinálise. A trombocitopenia é o achado mais importante em todo o curso da doença, podendo variar de 50 a 100.000 plaquetas/ μ l e, nos casos mais graves, pode chegar a 20.000 plaquetas/ μ l. Essa diminuição é ocasionada por maior consumo devido à vasculite, destruição imunomediada e sequestro esplênico (AGUIAR, 2015). Outra forma de diagnóstico é através da observação de mórulas em leucócitos parasitados na avaliação do esfregaço sanguíneo (MACHADO, 2004). Os métodos sorológicos também são utilizados como meio investigativo, sendo dos tipos ELISA e imunofluorescência indireta (IFI), métodos sensíveis na detecção de anticorpos. O teste molecular, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), é um meio inovador com maior especificidade e sensibilidade (CASTRO *et al.*, 2004). Rotineiramente os médicos veterinários consideram a baixa contagem plaquetária como um grande indício da doença, a alteração mais frequente da erliquiose é a trombocitopenia (JAIN, 1993; MENDONÇA *et al.*, 2005) e o diagnóstico precoce favorece o sucesso do tratamento e permite um melhor prognóstico ao paciente.

O tratamento para a erliquiose monocítica canina é baseado na antibioticoterapia, com fármacos da classe das tetraciclina, sendo a doxiciclina a de eleição, por ser a que vem apresentando maior sucesso no tratamento e menor recidiva da doença. A doxiciclina é absorvida no intestino e apresenta alta concentração no interior das células, ideal para infecções por bactérias intracelulares. É indicada a administração de 5 a 10 mg/kg, uma ou duas vezes ao dia, via oral por 21 a 28 dias (CRIVELLENTI; CRIVELLENTI, 2013; AGUIAR, 2015). Outras drogas disponíveis são a minociclina, oxitetraciclina, dipropionato de imidocarb e cloranfenicol (TILLEY *et al.*, 2003). O cloranfenicol é uma opção para erliquiose na fase crônica, pois o animal pode apresentar vômitos, impossibilitando o tratamento por via oral. Nestas circunstâncias o cloranfenicol pode ser administrado por via intravenosa, porém torna o tratamento mais dispendioso, por ser necessária a administração a cada oito horas (BARROS; DI STASI, 2012). Como tratamento suporte é necessário a fluidoterapia, reposição vitamínica e antieméticos, quando necessário. Em casos de citopenias graves, a transfusão sanguínea pode ser necessária. O uso de glicocorticoides, como a prednisolona na dose de 2mg/kg por 2 a 7 dias, é indicado quando a trombocitopenia for severa e houver indícios de desencadeamento de doença autoimune. Pode ser administrado o uso de imunomoduladores e suplementação com ferro para auxiliar no tratamento do animal (AGUIAR, 2015).

1.3 Anaplasmose canina

A *Anaplasma platys* é uma bactéria causadora da anaplasmose em cães, também conhecida por trombocitopenia cíclica infecciosa canina, pois tem a característica de eventos parasitêmicos, nos quais é possível encontrar o parasita nas células, seguido de trombocitopenia (GIGER, 2004; MARCONDES, 2009). Da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Anaplasma*, são microrganismos intracelulares obrigatórios gram-negativos (MCVEY *et al.*, 2016). Formam corpúsculos de inclusão em plaquetas, onde se multiplicam e são liberadas para a circulação infectando outras células (MARCONDES, 2009).

O vetor conhecido é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que adquire o agente quando se alimenta de um animal contaminado e transmite a doença durante o repasto sanguíneo, enquanto se alimenta de um animal saudável (SPARAGANO, *et al.*, 2003). A parasitemia tende a ocorrer periodicamente em intervalos de uma a duas semanas, e a trombocitopenia pode durar aproximadamente quatro dias (MACHADO; SILVA, 2010).

O desenvolvimento da *A. platys* no cão ainda não está completamente determinado, porém há indícios de que seja similar ao da *E. canis*. Além da trombocitopenia cíclica, a infecção pode causar também redução da agregação plaquetária, hiperplasia megacariocítica na fase aguda e hiperglobulinemia com aumento de IgA e IgM. A baixa contagem de plaquetas tende a se agravar com a evolução clínica da doença, pode haver uma diminuição nos eritrócitos e leucócitos, mas não necessariamente a ponto de causar anemia e leucopenia (GASPARNI *et al.*, 2008).

O período de incubação da *A. platys* é de oito a quinze dias, até o aparecimento dos primeiros sinais, sendo os mais comuns desordens digestivas, a exemplo de vômito e diarreia, anorexia, perda de peso, letargia, depressão e distúrbios hemostáticos, que podem variar de leves a graves. O diagnóstico para anaplasmose é dado a partir dos sinais clínicos, alterações hematológicas, principalmente a característica de trombocitopenia cíclica, além da visualização do agente em inclusões intraplaquetárias em esfregaço de sangue periférico ou papa de leucócitos. Testes sorológicos como fixação do complemento, hemaglutinação indireta, reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) vêm sendo utilizados para detecção de agentes da família Anaplasmataceae (MACHADO; SILVA, 2010). A PCR é considerada o teste de maior sensibilidade para este caso, pois permite detectar precocemente a infecção, auxiliar na classificação taxonômica da *A. platys*, avaliar a

eficácia do tratamento do animal infectado e identificar os carrapatos que podem servir de vetores para a doença (PERSING, 1996).

Assim como para a EMC, o tratamento para a anaplasmose é feito com uso de antibióticos da classe das tetraciclinas, sendo a de maior eficácia a doxiciclina, por ser capaz de manter alta concentração intracelular. O dipropionato de imidocarb se mostra eficaz, principalmente em casos de coinfeção por *Babesia* spp (DAGNONE, 2002).

1.4 Babesiose canina

A babesiose canina é causada por um parasita da classe Sporozoasida, família Babesiidae e gênero *Babesia*. As espécies envolvidas na enfermidade nos cães são as *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* (CARRET *et al.*, 1999; FORTES, 2004). A doença está amplamente distribuída por todo território brasileiro, acompanhando a epidemiologia do seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (SOARES, 2015).

A transmissão para o animal é feita pelo carrapato, que injeta no animal esporozoítas infectantes presentes em sua saliva. A *Babesia canis* invade eritrócitos e se multiplica por fissão binária, formando dois ou quatro indivíduos, até que as hemácias se rompem liberando merozoítos, que vão parasitar outros eritrócitos. No carrapato, ao serem ingeridas, tornam-se vermiformes e se reproduzem de forma sexuada, originando esporocinetos, que penetram diversos órgãos como glândula salivar e ovários, chegando aos ovos, onde se tornam redondos e permanecem até o estágio de ninfa, que é quando migram para a glândula salivar e se multiplicam até serem injetados em outro hospedeiro (TAYLOR *et al.*, 2010).

O parasita provoca a ruptura das hemácias durante sua reprodução, o que leva à eritrofagocitose causando um quadro de anemia regenerativa. Por conta desta destruição ocorre hemoglobinemia, hemoglobinúria e bilirrubinemia, sobrecarregando o sistema hepático, levando à icterícia, congestão hepática e esplênica. A liberação de pirógenos durante a ruptura dos eritrócitos acarreta na instituição do estado febril (SOARES, 2015). Nas infecções crônicas os parasitas se concentram nas redes capilares do baço e fígado, onde são liberados periodicamente na circulação (TAYLOR *et al.* 2010). Os animais infectados apresentam anemia regenerativa (CARLI *et al.*, 2009), baixo volume globular com ocorrência de trombocitopenia, porém sem causa esclarecida (FELDMAN *et al.*, 2000; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). Os mecanismos mais prováveis deste achado são por destruição mediada por anticorpos e maior consumo por causa da vasculite endotelial ou sequestro esplênico (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

As manifestações clínicas da babesiose canina variam de subclínica até hiperaguda, de acordo com idade do animal afetado, cepa da *Babesia*, intensidade da parasitemia, infecções concomitantes e capacidade de resposta imune do animal. O quadro febril está relacionado com anorexia, letargia e apatia, sendo os únicos sinais perceptíveis na forma subclínica da doença, podendo passar despercebida ou ser diagnosticada pelo achado incidental de merozoítos parasitando as hemácias (SOARES, 2015). Na forma aguda o cão apresenta anorexia, letargia e vômitos, além de anemia hemolítica, trombocitopenia e esplenomegalia. Na maioria das vezes o animal consegue se recuperar lentamente, porém em alguns casos, a doença pode levar o animal a óbito (PINTO, 2009). A forma hiperaguda se caracteriza pelo choque hipovolêmico, e em menos de um dia o animal apresenta anorexia e letargia, seguida de choque, hipóxia e coma ou morte (LAPPIN, 2015).

O diagnóstico de rotina da babesiose canina é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e algumas vezes na resposta terapêutica ao tratamento. Para diagnóstico direto pode ser utilizada a técnica do esfregaço de sangue periférico com a observação do parasita no interior das hemácias, porém, nas fases em que a protozoemia é baixa dificilmente é visualizado o parasita. A PCR é outro método de diagnóstico direto em que é pesquisado fragmentos de DNA em amostras sanguíneas ou tecidos do hospedeiro. É um teste de alta especificidade e sensibilidade pois permite a detecção mesmo em baixas concentrações. As técnicas de diagnóstico indireto, para detecção de anticorpos antibabésia, são mais aplicadas em casos crônicos ou com finalidade de pesquisa epidemiológica. Em casos agudos, este método é ineficiente pois leva um tempo para que o organismo formule imunoglobulinas específicas (SOARES, 2015).

Vários fármacos são utilizados na terapêutica de infecções com *Babesia* spp., as escolhas mais eficazes são administração do diminazeno em dose única de 3,5 a 7 mg/kg na via subcutânea, ou do imidocarb em duas aplicações de 5 a 7 mg/kg na via subcutânea com intervalo de 14 dias. É importante ter o cuidado nos efeitos colaterais destes medicamentos, como dor no local da aplicação, salivação excessiva, vômitos, diarreias. No intuito de prevenir tais reações é recomendado a aplicação de 0,04 mg/kg de atropina dez minutos antes da aplicação do antiparasitário. O tratamento com a doxiciclina, na dose de 10mg/kg duas vezes ao dia durante 11 dias, é eficaz para a diminuição da parasitemia e melhora no quadro clínico (ADAMS, 2013; SOARES, 2015).

1.5 Hepatozoonose canina

A hepatozoonose canina é causada pelo *Hepatozoon*, um protozoário da classe Coccidia, ordem Eucoccidiorida e família Hepatozoodea. Duas espécies foram identificadas, o *H. canis* encontrado na Europa, África, Ásia e na América do Sul, e *H. americanum*, relatado no sul dos Estados Unidos (FORLANO *et al.*, 2007). O *Hepatozoon* possui um formato elipsoide, medindo 11 por 4 μm e é encontrado parasitando neutrófilos, envolto em uma membrana espessa. Seu ciclo envolve dois hospedeiros: o definitivo onde ocorre a singamia, o carrapato, e o intermediário, o cão, onde ocorre a reprodução assexuada. O *R. sanguineus* carrega oocistos, que contêm numerosos esporozoítas em sua hemocele, e o cão pode infectar-se ao ingerir este ectoparasita. Os esporozoítas são liberados no intestino e penetram em sua parede. São transportados pelo sangue até os órgãos alvos, infectando baço, fígado, pulmão, rins, linfonodos e medula óssea. Em seguida, acontece a merogonia, no interior de macrófagos e células endoteliais. Quando o meronte amadurece, as células se rompem liberando os merozoítas que penetram em neutrófilos circulantes e desenvolvem os gamontes. O ciclo se completa quando o carrapato ingere sangue de animal infectado (TAYLOR *et al.*, 2010).

No geral a hepatozoonose canina afeta animais imunossuprimidos ou com outra infecção presente, como parvovirose, babesiose, erliquiose, leishmaniose ou toxoplasmose (GÓMEZ; FEIJOÓ, 2012). Quando o protozoário chega ao fígado, pulmões e rins, o cão pode desenvolver hepatite, pneumonia e glomerulonefrite, respectivamente (BANETH; SHKAP, 2003). Em alguns casos pode haver degeneração e atrofia da musculatura esquelética (PALUDO *et al.*, 2005) A manifestação clínica pode variar de assintomática em quadros de baixa parasitemia a letal para casos com parasitemia alta. A maioria dos pacientes positivos apresentam infecção leve devido a uma pequena reação inflamatória (TAYLOR *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos são inespecíficos e variam de acordo com o estado imunológico do hospedeiro. O animal apresenta febre intermitente, apatia, anorexia, caquexia, atrofia muscular generalizada, dor com relutância ao movimento, rigidez de pescoço e/ou tronco, paraparesia e ataxia, corrimento ocular mucopurulento bilateral, uveíte leve e outras lesões oculares. Poliúria e polidipsia pode acontecer em casos de acometimento dos rins. Outros sintomas são descritos: linfadenomegalia, esplenomegalia, petéquias, equimoses, epistaxe, diarreia sanguinolenta transiente e palidez das membranas mucosas (MARCONDES, 2009; GÓMEZ; FEIJOÓ, 2012).

O diagnóstico é feito com base nos sinais clínicos e achados laboratoriais. Na maioria dos casos o hemograma apresenta uma leucocitose variável de 20.000 a 200.000 células/ml,

neutrofilia com ou sem desvio a esquerda, contudo pode acontecer neutropenia, eosinofilia e linfopenia. A anemia pode ser arregenerativa, em algumas vezes grave, e trombocitopenia, pode ocorrer por acometimento medular. As alterações bioquímicas são: aumento dos valores de fosfatase alcalina e creatinina quinase, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Pode ser encontrado proteinúria em casos de lesões glomerulares. O diagnóstico definitivo da infecção é dado pela observação do organismo em esfregaço sanguíneo. Outro método é por meio de biópsia ou exame *post-mortem* para detecção de formas teciduais da *H. canis* (GÓMEZ; FEIJOÓ, 2012). Uma técnica de imunofluorescência indireta foi desenvolvida para a identificação de anticorpos antihepatozoon e tem se mostrado mais sensível que o exame de esfregaço sanguíneo. Análises moleculares como a PCR também são utilizadas na identificação do agente, sendo um diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade, tanto no cão quanto no vetor (CHIARELI, 2009).

O tratamento da infecção por *H. canis* é feito com dipropionato de imidocarb na dose de 5 a 6 mg/kg com aplicações a cada 14 dias até que, no exame de esfregaço sanguíneo não seja mais visualizado os gamontes. Pode ser associado com o uso da doxiciclina por via oral, na dose de 10 mg/kg durante 21 dias. É recomendado o tratamento de todos os cães, até mesmo os daqueles assintomáticos, pois com o tempo a parasitemia pode evoluir e tornar-se uma infecção grave. A terapêutica pode perdurar por até 8 semanas e deve ser feita avaliação hematológica regular (TAYLOR *et al.*, 2010).

1.6 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária, que permite o estudo de sequências de ácidos nucleicos, tendo como base a síntese enzimática de cópias genéticas (MOLINA *et al.*, 2004). Foi desenvolvida por Kary Banks Mullis (prêmio Nobel de química de 1993 pelo desenvolvimento dessa técnica) em abril de 1983. São empregados os quatro nucleotídeos de DNA (dNTPs – A, T, C e G), o *primer* ou sequência iniciadora, uma DNA polimerase termoestável (*Taq*), cloreto de magnésio (MgCl₂), que age como cofator da *Taq*, um tampão, geralmente a base de cloreto de potássio, para manter o pH da reação, a amostra de DNA que vai servir de molde para a replicação, e água ultrapura como diluente (HAAS; TORRES, 2016).

Os *primers* são adicionados aos pares, um senso e um anti-senso, que irão se anelar por complementariedade cada fita simples de DNA. São sequências de 18 a 22 nucleotídeos sintetizados *in vitro* que vão determinar o segmento a ser replicado. A sequência escolhida

nos casos de identificação de microrganismos é parte de um gene conservado da espécie procurada, sejam genes essenciais ao ciclo de vida ou o 16S ribossomal (PETTI *et al.*, 2005).

A reação acontece em basicamente três etapas: desnaturação da fita dupla de DNA pelo calor, anelamento de cada *primer* a uma das fitas simples de DNA, e a extensão e polimerização da fita, com a adição de nucleotídeos e ação da *Taq* (ERLICH, 1995).

A PCR começou a ser utilizada a partir de 1980, como diagnóstico alternativo àqueles tradicionais para identificação de agentes infecciosos. Sua vantagem é a capacidade de detecção do agente com alta especificidade e sensibilidade, sem a necessidade de que o microrganismo se encontre viável na amostra biológica, tornando-se um método confiável para o diagnóstico e monitoramento das doenças dos animais (HOFMANN, *et al.*, 2008 apud HAAS; TORRES, 2016).

Pequenas quantidades de DNA podem ser detectadas em amostras biológicas diversas, como sangue, leite, fezes, secreções e tecidos por meio da PCR. Esta técnica vem tornando-se cada vez mais rápida e com menor custo financeiro. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda a utilização da PCR como meio diagnóstico para diversas doenças infecciosas, inclusive para trânsito internacional de animais (OIE, 2017).

1.7 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram identificar, com uso da PCR, os animais infectados com *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. que apresentavam trombocitopenia no Hospital Veterinário da UFPB; avaliar a existência de coinfeções por estes agentes e comparar os resultados com os diagnósticos feitos pelo exame de estirado sanguíneo em lâmina de microscopia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram selecionadas 88 amostras de sangue de cães que apresentaram trombocitopenia no hemograma solicitado pelo médico veterinário do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba. Foram separados 200 µl de cada amostra de sangue e armazenados sob temperatura de -80°C até a extração do DNA. Em seguida, foram anotados os resultados da pesquisa de hemoparasitas, daqueles que foram solicitados, para posterior comparação com a análise molecular. A pesquisa direta de hemoparasita em estirado sanguíneo periférico foi realizada pelo laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFPB, seguindo protocolo determinado pelo laboratório.

2.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir das amostras armazenadas, com a utilização do kit comercial G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida foi aferida a concentração de DNA de cada extração e realizada a diluição de cada amostra para uma concentração final de 20 ng/µl. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da realização das reações.

2.3 PCR (reação em cadeia de polimerase)

As reações de PCR foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital veterinário da UFPB. Em todas foram utilizados controles positivos e negativos para avaliar a ocorrência de contaminação e especificidade da reação. O controle positivo foi obtido a partir da amostra de DNA do sangue de cão positivo em exame de microscopia para cada agente (*E. canis*, *A. platys*, *Babesia* spp e *Hepatozoon* spp), o negativo foi adicionado água no lugar da amostra.

2.3.1 Primers

As sequências dos *primers* utilizados nas ampliações de cada genoma encontram-se na tabela 1. A tubulina beta foi utilizada como controle endógeno.

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados nas reações para cada gene pesquisados.

Genes	Sen tido	Sequência (5´-3´)	Pares de base	Referência / acesso no Genbank
<i>Babesia</i> spp. 18S rRNA	►	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	551	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2012)
	◄	GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG		
<i>Hepatozoon</i> spp. 18S sRNA	►	GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC	574	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2012)
	◄	ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG		
<i>Ehrlichia canis</i> VirB9	►	CATTATCATTTC AATACGTA ACTC	959	FELEK <i>et al.</i> , 2003)
	◄	TTTTGATTTTCTTCTGACATAGTG		
<i>Anaplasma platys</i> 16S rRNA	►	AAGTCGAACGGATTTTTGTC	504	(GOTSCH <i>et al.</i> , 2009)
	◄	CTCTCCCGGACTCTAGTC		
Tubulina Beta	►	CAGCAAGATCCGTGAAGAGT	123	BT030522.1
	◄	ACCAGCTGATGGACAGAGAG		

► = foward; ◄ = reverso

2.3..2 PCR

Na mistura da PCR para foram adicionados 0,2 µM de cada *primer*, 1X de tampão de PCR (Quatro G), 2 mM de MgCl₂ (Quatro G), 200 µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Eco diagnóstica), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Quatro G), 80 ng de DNA (*E. canis*) ou 100 ng (*A. platys*, *Babesia* spp e *Hepatozoon* spp.) de genômico da amostra a ser testada, e H₂O para um volume final de 25 µl. As condições de amplificação foram de 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do *primer* (a 56°C para *E. canis*, 60°C para *A. platys*, 51° para *Babesia* spp e 52° para *Hepatozoon* spp.) por 30 segundos e extensão a 72° por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos. Quando as amostras testadas tiveram resultados negativos para todos os genes, foram submetidas a reação para amplificação da tubulina beta, usada como controle endógeno. As reações foram realizadas conforme descrição acima, utilizando 80 ng de DNA e temperatura de anelamento do primer de 60°C.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Neotaq Brilliant Green Plus (NeoBio), um DNA Ladder (100 pares de base – Kasvi) foi adicionado ao gel para servir de padrão para determinar o peso molecular dos

produtos. O gel foi visualizado no foto documentador (L-Pix Chemi Molecular Imaging - Loccus Biotec).

2.4 Análise dos dados

Em um total de 88 amostras foram feitas as contagens absolutas e relativas das amostras positivas para cada hemoparasita e das amostras negativas para todas as doenças. Em seguida foram calculadas as quantidades de amostras positivas para apenas uma doença, identificada qual a doença e feita a contagem absoluta e relativa a este grupo de amostras. Foi repetido o processo com as amostras positivas para duas e três doenças.

Em relação aos dados coletados dos exames da pesquisa de hemoparasitas, esses foram classificados em “Positivos para Hemoparasitose” (aqueles que tinham diagnóstico ou suspeita no exame de microscopia), “Não solicitados” (aqueles em que o médico veterinário não solicitou) e “Negativos” (aqueles negativos no exame de microscopia). Foi realizada uma contagem de quantas amostras classificadas em “Não solicitados” e em “Negativos” foram positivas para um ou mais hemoparasitas no exame da PCR.

Por fim, foi realizada uma comparação com as amostras positivas em lâmina e os respectivos resultados da PCR, com objetivo de confirmar ou não o diagnóstico da microscopia.

2.5 Aspectos éticos

O projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFPB sob protocolo nº 018/2017, e aprovado no dia 17/05/2017.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Verificou-se pelo exame da PCR que, das 88 amostras testadas, 78 (89%) foram positivas para algum parasita. Do total 63 (72%) foram positivas para *Hepatozoon* spp., 39 (44%) para *Babesia* spp., 25 (28%) para *E. canis*, 13 (15%) para *A. platys* e dez amostras (11%) foram negativas para todos os parasitas (FIGURA 1).

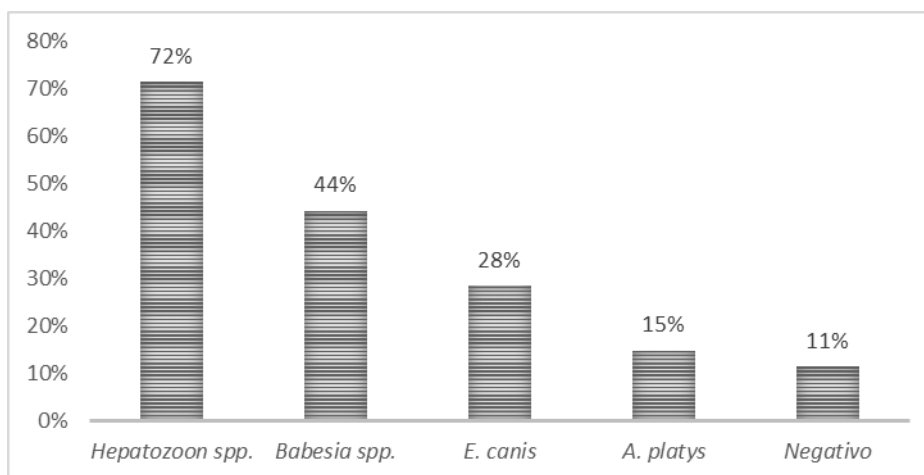


Figura 1. Percentual dos hemoparasitas nos resultados obtidos no exame da PCR em amostras sanguíneas de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.

A frequência de amostras infectadas por *Hepatozoon* spp. neste trabalho foi superior em comparação com os resultados obtidos com a PCR por Chiareli (2009), que foi de 37,97% e maior ainda que a de 3,63% relatada por Ramos *et al.* (2015). Este alto índice de animais infectados por *Hepatozoon* spp. deve servir de alerta aos clínicos, já que comumente a manifestação dos sinais clínicos acontece somente após imunossupressão ou outra doença concomitante, e desta forma a infecção pode passar despercebida.

O percentual de amostras positivas para *Babesia* spp. neste estudo foi superior aos encontrados por Lopes (2006) e Lemos (2009), que foi de 8% e 6,8%, nesta ordem, utilizando-se o mesmo método diagnóstico. A ocorrência de *E. canis* foi menor do que as observadas por Ueno *et al.* (2009) e Oliveira (2015), que foram respectivamente de 40% e 61% das análises realizadas por PCR, porém compatível com Witter *et al.* (2013) que obteve uma frequência de 23% de animais positivos na PCR. A ocorrência de *A. platys* foi condizente com resultados dos autores Santos *et al.* (2009) e Silva *et al.* (2012), que constataram, com uso do diagnóstico molecular, a ocorrência de 14,9% e 19,4% de amostras infectadas.

A ocorrência de 11% de amostras negativas deste trabalho é baixa quando comparada a de Oliveira (2015), da qual 20% não apresentavam hemoparasitoses. Ainda conforme o autor, a trombocitopenia destes casos pode ser devido a infecções por outros agentes não pesquisados que também levam a esta condição patológica ou a erros na contagem de plaquetas, seja por descalibragem dos contadores automáticos, amostra com agregação plaquetária, homogeneização ineficiente ou outro fator que induza à pseudotrombocitopenia.

Do total de 88 amostras, 32 (36%) foram positivas para apenas um agente, 30 (34%) positivas para dois parasitas e 16 (18%) apresentaram-se positivas para três microrganismos. Nenhuma das amostras foi positiva para os quatro agentes simultaneamente (FIGURA 2).

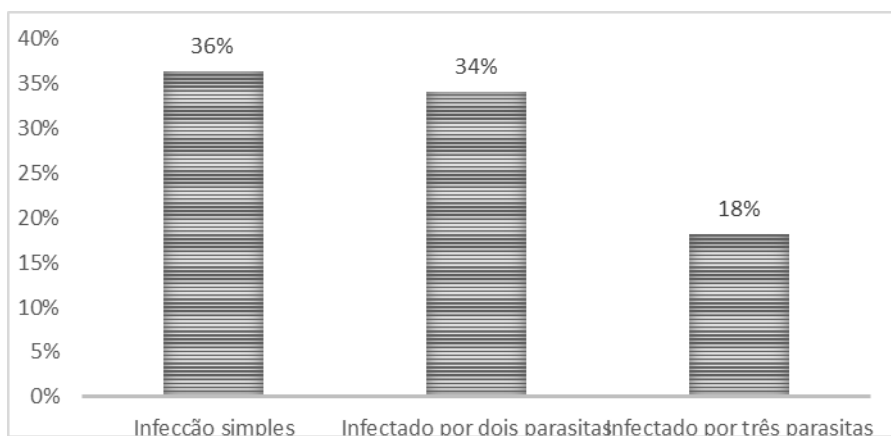


Figura 2. Percentual de amostras sanguíneas com infecções simples, infectadas por dois parasitas e infectadas por três parasitas, de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB

Esta incidência de coinfeções é justificada pelo fato de que os hemoparasitas em questão apresentam vetores comuns, como os carrapatos *R. sanguineos*. Costa (2011) detectou 14,66% de infecções mistas em suas amostras com trombocitopenia, número bem abaixo do encontrado neste trabalho.

Neste trabalho, os animais com infecção simples apresentaram uma média de 85,66 ($\pm 72,62$) plaquetas/ μ l os infectados por dois parasitas apresentaram uma média de 62,97 ($\pm 62,87$) plaquetas/ μ l; e os que se apresentaram infectados por três parasitas apresentaram uma média de 73,56 ($\pm 58,52$) plaquetas/ μ l. Segundo Costa 2011, estas coinfeções tem a probabilidade de provocar seis vezes mais a trombocitopenia do que em infecções por apenas um agente, o que não foi observado nesse trabalho. No entanto, considerando o percentual de coinfeções observadas, é aconselhável utilizar métodos mais eficazes para diferenciar estas infecções, com propósito de uma melhor escolha terapêutica.

De todas as amostras, 21 (24%) foram positivas apenas para *Hepatozoon* spp., cinco (6%) para apenas *Babesia* spp. e seis (7%) para apenas *E. canis*. Não foram observadas amostras positivas apenas para *A. platys*. Das amostras se apresentaram positivas para mais de um parasita simultaneamente, sete (8%) foram positivas para *Hepatozoon* spp. e *E. canis*, 14 (16%) positivas para *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp., cinco (6%) positivas para *Hepatozoon* e *A. platys*, e quatro (5%) positivas para *E. canis* e *Babesia* spp. Houve ainda amostras positivas para três parasitas simultaneamente, tratando-se de oito (9%) positivas para *Hepatozoon* spp., *E. canis* e *Babesia* spp., sete (8%) positivas para *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. e *A. platys*, e uma amostra (1%) positiva para *Hepatozoon* spp., *E. canis* e *A. platys* (TABELA 2).

Tabela 2. Resultado da PCR de hemoparasitas em amostras sanguíneas de cães trombocitopênicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.

Hemoparasitas	Nº de amostras positivas	% de amostras positivas
<i>Hepatozoon</i> spp.	21	24%
<i>Babesia</i> spp.	5	6%
<i>E. canis</i>	6	7%
<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>E. canis</i>	7	8%
<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Babesia</i> spp.	14	16%
<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>A. platys</i>	5	6%
<i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> spp.	4	5%
<i>Hepatozoon</i> spp., <i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> spp.	8	9%
<i>Hepatozoon</i> spp., <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	1	1%
<i>Hepatozoon</i> spp., <i>Babesia</i> spp. e <i>A. platys</i>	7	8%
Nenhum hemoparasita	10	11%
Total	88	100%

Os resultados, em relação às coinfeções, pouco se assemelharam com os de outros autores. Oliveira (2015) também identificou infecções mistas em suas amostras, sendo que 12% foram positivas para *Hepatozoon* spp. e *E. canis*, 5% estavam infectadas por *Hepatozoon* spp, *E. canis* e *Babesia* spp, e 8% foram diagnosticadas para *E. canis* e *Babesia* spp. Por outro lado, Costa (2011) obteve percentuais menores em amostras trombocitopênicas. O autor

detectou que 1,3% foram positivas para *E. canis* e *Hepatozoon* spp., 5,3% para *E. canis* e *Babesia* spp., 4% para *E. canis* e *A. platys*, 0,6% para *Hepatozoon* spp, *E. canis* e *A. platys*, e 0,6% para *E. canis*, *A. platys* e *Babesia* spp. Estes resultados enfatizam a necessidade do diagnóstico molecular, afim de identificar os agentes causadores da infecção para que os tratamentos empregados abranjam todos os parasitas envolvidos.

Das 88 amostras, 53 (60,2%) foram solicitadas para o exame de pesquisa de hemoparasitas, e nas 35 (39,8%) restantes não houve a solicitação. Dos resultados do exame de microscopia, 28 tiveram resultados positivos para um ou mais parasitas e 25 tiveram resultados negativos. Foi feito um comparativo entre os resultados da PCR e os do exame de pesquisa de hemoparasitas, afim de avaliar quantas amostras deixaram de ser diagnosticadas pelo método da microscopia. Das 35 amostras não examinadas microscopicamente, 29 (82%) foram positivas para pelo menos um parasita e das 25 tidas como “Negativo”, 21 (84%) foram diagnosticadas no exame da PCR para algum parasita (TABELA 3.).

Tabela 3. Relação das classificações das solicitações de exames de microscopia comparados com os resultados da PCR para identificação de hemoparasitas em amostras sanguíneas de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.

Pesquisa de Hemoparasitas		PCR	
Classificação no exame	Nº	Nº de resultados positivos	% de positivos relativa à classificação no exame
Positivo para Hemoparasitoses	28	28*	100%
Negativo	25	21	84%
Não solicitado	35	29	82%

* Os resultados das 28 amostras positivas na pesquisa de hemoparasitas e na PCR tiveram algumas divergências em relação a qual parasita estava presente na amostra. Resultados serão melhor detalhados na Tabela 4.

A divergência no número de amostras negativas na microscopia e positivas na PCR pode ser em razão da baixa parasitemia em fases não agudas das doenças, que dificulta a visualização do agente no exame, ocasionando diagnósticos falso negativos (DANTAS-TORRES, FIGUEREDO e BRANDAO-FILHO, 2006). Por isso a PCR é considerada mais sensível, pois mesmo em baixa parasitemia tem a capacidade de identificar o DNA do parasita no sangue, como constatou Valente (2014). O número de amostras nas quais não foi solicitado

o exame de pesquisa de hemoparasitas e que foram positivas na PCR alerta a necessidade da solicitação de um método diagnóstico direto, tanto nos casos de trombocitopenia, bem como nos demais.

A comparação entre as amostras positivas no exame da lâmina e os resultados da PCR foi realizada afim de confirmar ou não a presença do parasita no sangue do animal. Para a *E. canis*, foram 14 positivos no exame da microscopia, dos quais, cinco (35,7%) foram confirmados e nove (64,3%) não confirmados na PCR. Em relação aos confirmados, quatro deles apresentaram também outros agentes na PCR, e aos não confirmados, foram encontrados outros hemoparasitas. Para *A. platys* foram diagnosticadas quatro amostras no exame da pesquisa de hemoparasitas, porém apenas uma (25%) foi confirmada com a PCR, mostrando-se positiva também para outro agente, as três (75%) amostras não confirmadas foram positivas para outras hemoparasitoses. Sete amostras foram diagnosticadas com *Babesia* spp. no exame de pesquisa de hemoparasitas, porém cinco (71,4%) confirmadas, sendo duas positivas apenas para *Babesia* spp e as outras três positivas também para outros agentes. As duas (28,6%) amostras não confirmadas foram positivas para outros microrganismos. O *Hepatozoon* spp. foi visualizado em seis amostras, sendo cinco (83,3%) confirmadas positivas também, para outras doenças. A amostra que não foi confirmada (16,7%) com o exame da PCR apresentou positividade para *Babesia* spp. A tabela 4 detalha os resultados acima descritos.

Tabela 4. Tabela comparativa entre os resultados do exame de pesquisa direta de hemoparasitas e os resultados da PCR para cada agente infeccioso diagnosticado em amostras sanguíneas de cães com trombocitopenia atendidos no Hospital Veterinário da UFPB, Areia, PB.

Agentes pesquisados	Nº de amostras positivas em lâmina *	Nº (%) confirmados na PCR	Nº (%) não confirmados na PCR
		Infecções identificadas	Infecções identificadas
<i>E. canis</i>	14	5 (35,7%) HE, E, HEA, EB, HEB	9 (64,3%) B, B, H, HBA, HBA, H, H, HA, HBA
<i>A. platys</i>	4	1 (25%) HA	3 (75%) H, H, HEB
<i>Babesia</i> spp.	7	5 (71,4%) B, HB, HEB, HBA, B	2 (28,6%) HE, HEA
<i>Hepatozoon</i> spp.	6	5 (83,3%) HB, HB, HEB, HB, HA	1 (16,7%) B

*Três amostras foram positivas para mais de uma doença no exame da lâmina. E = *E. canis*, B = *Babesia* spp., H = *Hepatozoon* spp., HE = *Hepatozoon* spp. e *E. canis*, HB = *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp., HA = *Hepatozoon* spp. e *A. platys*, EB = *E. canis* e *Babesia* spp., HEB = *Hepatozoon* spp., *E. canis* e *Babesia* spp., HEA = *Hepatozoon* spp., *E. canis*, e *A. platys*, HBA = *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp., e *A. platys*.

No estudo de Meneses *et al.* (2008), em quatro das 75 amostras suspeitas de erliquiose foram observadas mórulas em esfregaço sanguíneo, porém uma delas não foi confirmada na PCR, correspondendo a 25% de resultado falso positivo no esfregaço sanguíneo. Ferreira *et al.* (2007) compararam a análise microscópica de 15 animais com inclusões intraplaquetárias características de *A. platys* com resultados da PCR, constatando que três foram PCR negativos, correspondendo a 20% falsos positivos no exame de microscopia. Valente (2014) constatou que os resultados positivos para *Babesia* spp. no exame de pesquisa de hemoparasitas foram todos confirmados pela PCR, porém houve diagnósticos falso negativos. Na pesquisa de Rubini (2006) foi observado que em 17 (11,3%) das amostras foram visualizados gamontes compatíveis com *Hepatozoon* spp no interior de monócitos e

neutrófilos, já na PCR foram diagnosticados 80 (53,3%) amostras positivas para este agente, sendo todas as amostras positivas em lâmina confirmadas por este método. Segundo Harrus e Waner (2011) nem sempre as inclusões observadas nas células sanguíneas são efetivamente mórulas, mostrando a necessidade da confirmação por PCR. Esta pode ter sido a causa da ocorrência de resultados positivos no exame de pesquisa microscópica não confirmados no exame da PCR, ou pelo fato de que muitos dos resultados dados pelo exame da microscopia eram apenas suspeita de visualização do agente. Outro possível motivo de não confirmação pela PCR é o caso de baixa concentração de DNA do parasita na amostra sanguínea, sendo insuficiente para amplificação na reação.

4 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que há uma alta prevalência de hemoparasitoses em cães com trombocitopenia, sendo mais frequente a presença do *Hepatozoon* spp. A presença de coinfeções deve ser considerada nos casos de trombocitopenia e a confirmação do diagnóstico por técnicas moleculares pode auxiliar na escolha terapêutica mais efetiva.

O diagnóstico da PCR mostrou-se mais sensível e específico quando comparado com o exame de pesquisa de hemoparasitas por microscopia, revelando ser um método importante a ser inserido na rotina de solicitações de diagnóstico do Hospital Veterinário da UFPB.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Koogan, 2013.
- AGUIAR, D. M. Erliquioses. In: JERICÓ, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ª. ed. São Paulo: Roca, v. 1, 2015. Cap. 83, p. 757-764.
- ALMEIDA, A. P. *et al.* Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks Tick Borne Disease**, v. 3, n. 4, p. 203-206, 2012.
- BAKER, D. C. Diagnóstico das Anormalidades de Hemostasia. In: THRALL, M. A., *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª. ed. São Paulo: Roca, 2015. p. 394-439.
- BANETH, G.; SHKAP, V. A. V. S. M. C. Baneth, G. and V. Shkap. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. **Journal of Parasitology**, n. 89, p. 379-381, 2003.
- BARROS, C. M.; DI STASI, L. C. **Farmacologia veterinária**. Barueri: Manole, 2012.
- BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose Canina: Revisão. **Clínica Veterinária**, v. 41, p 50-59, 2002.
- CARLI, E. *et al.* Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Veterinarian Parasitology**, p. v. 162, p. 51-57, 2009.
- 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 Eukaryot Microbiology**, p. v. 6, p. 298-303, 1999.
- CASTRO, M. B. *et al.* Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2004.

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

COSTA, H. X. **Interaction of hemoparasites and hemoparasitoses in clinical cases of thrombocytopenia in dogs in the city of Goiânia.** Dissertação de mestrado em Ciências Agrárias da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 73. 2011.

CRIVELLENTI, S. B.; CRIVELLENTI, L. Z. **Bulário Médico-Veterinário – Cães e Gatos.** 1. ed. São Paulo: MedVet, 2013.

DAGNONE, A. S. **Soroepidemiologia e avaliação citológica e molecular da infecção por Ehrlichia sp em cães de uma população hospitalar.** Dissertação de mestrado em Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina. [S.l.], p. 131. 2002.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology** , v. 141, p. 197-203, 2006. ISSN 3-4.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDAO-FILHO, S. P. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006. ISSN 0037-8682.

ERLICH, A. E. Molecular Biology and biotechnology: A comprehensive desk reference. In: ERIICH, A. E. **PCR Tecnologic.** New York: VCH, 1995. p. 641-648.

FELDMAN, B. F.; ZINKI, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 5^a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

FELEK, S.; HUANG, H.; RIKISHIA, Y. Sequence and Expression Analysis of virB9 of the Type IV Secretion system of Ehrlichia canis strains in ticks, dogs, and cultured cells. **Infection Immunity**, v. 71, p. 6063-6067, 2003.

FERREIRA, R. F. *et al.* Anaplasma platys diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5, p. 113-119, 2007.

FIGUEIREDO, M. R. **Babesiose e erliquiose caninas**. Monografia de especialização do Curso de PósGraduação em Clínica Médica de Pequenos Animais. Rio de Janeiro, p. 30. 2011.

FORLANO, M. D. *et al.* Molecular characterization of Hepatozoon sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other Hepatozoon spp. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 21-30, 2007.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária. 4ª ed. São Paulo: Ícone**. p. 370 – 372, 2004. 4ª. ed. São Paulo: Ícone, 2004.

GASPARNI, M. R. *et al.* Ocorrência de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. **XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Curitiba, v. 15, 2008.

GIGER, U. Anemias regenerativas causadas por hemorragia ou hemólise. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, v.2. 2004. p. 1880-1902.

GÓMEZ, V. N.; FEIJOÓ, S. **Clínica médica de animales pequeños I Editora Eudeba 666 p. 2012**. 1ª. ed. Buenos Aires: Eudeba, 2012.

GOTSCH, S. *et al.* Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 171-174, 2009.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de pcr no diagnóstico de Doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica De Medicina Veterinária**, janeiro 2016.

HAAS, J. D.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de pcr no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, v. 26, JANEIRO 2016. ISSN ISSN:1679-7353.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 292-296, 2011.

HOFMANN, M. *et al.* Bluetongue Disease Reaches. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, Switzerland, v. 150, p. 49-56, 2008.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 1^a. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.: Lea & Febiger, 1993.

LABARTHE, N. *et al.* Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, p. 67-75, 2003.

LAPPIN, M. R. Infecções Protozoárias Polissistemicas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5^a. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 1367-1383.

LEMONS, T. D. **Frequencia e caracterização molecular de Babesia spp. em cães naturalmente infectados no município de Teresópolis – RJ**. Dissertação de mestrado em medicina veterinária - Clínica e Reprodução Animal Dda Universidade Federal Fluminense. Niteroi, p. 73. 2009.

LOPES, V. V. A. **Estudo parasitológico e molecular da infecção por babesia spp. Em cães de áreas rurais do estado de São Paulo**. LOPES Dissertação de mestrado Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, p. 78. 2006.

MACHADO, G. P.; S., D. A.; SILVA, B. F. Anaplasmosse trombocítica canina - uma breve revisão. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Julho 2010.

MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, v. 13, p. 53-57, 2004.

MARCONDES, C. B. **Doenças Transmitidas e Causadas por Artópodes**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

MCDADE, J. E. Ehrlichiosis: a disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 609-617, 1990.

MCVEY, S. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária - 3ª ed 3. ed. - Rio de Janeiro**: Guanabara Koogan, 2016. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MENDONÇA, C. S. *et al.* Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 1, p. 167-174, 2005.

MENESES, I. D. S. *et al.* Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. **Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico**. Hospital Israelita Albert Einstein. São Paulo. 2004.

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**, 2008.

OIE. **Organização Mundial de Saúde animal**, 2017. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>>. Acesso em: 15 julho 2017.

OLIVEIRA, A. C. **Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia molecular, alterações hematológicas e centrifugação por gradiente**. Tese de doutorado da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 64. 2015.

PALUDO, G. R. *et al.* Hepatozoon spp.: pathological and partial 18SrRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**, v. 97, p. 167-170, 2005.

PERSING, D. H. PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. A supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. **ASM Press**, Washington, p. 190, 1996.

PETTI, C. A.; POLAGE, C. R.; P., S. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal Clinical Microbiology**, n. 43, p. 6123-6125, 2005.

PINTO, R. L. **Babesiose canina - relato de caso**. Monografia de Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Porto Alegre, p. 26. 2009.

RAMOS, C. A. N. *et al.* Identificação molecular de Hepatozoon canis em cães de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, 2015.

REBAR, A. *et al.* **Guia de Hematologia para Cães e Gatos**. 2^a. ed. São Paulo: Roca, 2003.

RUBINI, A. S. **Aspectos epidemiológicos da infecção por Hepatozoon spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) em cães de áreas rurais do estado de São Paulo, Brasil e caracterização molecular de isolados**. Dissertação de mestrado em medicina Veterinária da Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. Botucatu, p. 68. 2006.

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**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, p. 59. 2006.

SANTOS, F. *et al.* Molecular evaluation of the incidence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys and Babesia spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SILVA, G. C. *et al.* Occurrence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in household dogs from northern Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SOARES, J. M. Piroplasmoses. In: JERICÓ, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ª. ed. São Paulo: Roca, v. 1, 2015. Cap. 82, p. 741-756.

SPARAGANO, O. A. E. *et al.* Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 527-534, 2003.

STOCKHAM, L. S.; SCOTT, A. M. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. **Blackwell Publishing**, p. 223, 2008.

TAKAHIRA, R. K.; MATTOSO, C. R. S. Distúrbios da hemostasia. In: JERICÓ, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ª. ed. São Paulo: Roca, v. 2, 2015. Cap. 205-207, p. 1870-1894.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TILLEY, L. P.; SMITH, J.; FRANCIS, W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos**. 2ª. ed. Barueri: Manole, 2003.

UENO, E. H. *et al.* Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. Bras. Parasitol. Vet.** v. 18, n. 3, p. 57-61, julho-setembro 2009.

VALENTE, P. C. L. G. **Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 58. 2014.

WITTER, R. *et al.* **Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso**. Seminário de Ciências Agrárias v. 34, n. 6. Londrina: [s.n.]. 2013. p. 3811-3822.