

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

Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp.,
Anaplasma platys e *Hepatozoon* spp. em cães anêmicos atendidos
no Hospital Veterinário da UFPB

Magda Fernandes

Areia, 2017

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

Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB

Magda Fernandes

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

Areia, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Magda Fernandes

Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em: 26 / 07 / 2017

Nota: 10,0

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Danila Barreiro Campos
Departamento de Ciências Veterinárias/UFPB
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Ivía Carmem Talieri
Departamento de Ciências Veterinárias/UFPB

Dr.^a Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano
Hospital Veterinário/UFPB

Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Coordenação de TCC

Areia, 2017

*Este trabalho é dedicado a meus pais, Geraldo Fernandes
Pessoa e Aparecida Florêncio Fernandes, e a minha irmã,
Vitória Fernandes.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, merecedor de toda honra e glória, sem suas bênçãos e proteção nada seria possível.

À minha orientadora, Danila Barreiro Campos, que possibilitou o desenvolvimento e conclusão do trabalho; agradeço a oportunidade de trabalhar com ela durante esses dois anos.

Aos meus pais, Geraldo Fernandes Pessoa e Aparecida Florêncio Fernandes, e minha irmã, Vitória Fernandes; que se uniram a mim, em busca do meu sonho de me tornar Médica Veterinária, e me apoiaram durante todo esse tempo.

À toda minha família, que também contribuiu para minha formação; incentivaram e me apoiaram sempre.

À Luíza Monteiro que desenvolveu esse projeto comigo.

À Maria da Conceição que também nos ajudou a desenvolver essa pesquisa.

A todos que fazem parte do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário.

À minha turma, 2012.1; juntos, formamos uma verdadeira família. Aos que também se tornarão médicos veterinários em breve e aos que trilharam outros caminhos. Boa sorte a todos vocês!

Aos meus colegas, amigos e irmãos, Alexandra Melo (Alê), Ana Clarisse (a Nêga), Antônio Virgínio (Tonny), Ayrton Senna, Débora Ângelo (Debrita), Juliany Gomes (Ju ou Baiana para os íntimos), José Augusto (o Vêi), Ricardo Torres (Rico) e Rodrigo Alves (Rodrigão). Vocês foram essenciais durante esses cinco anos; juntos passamos várias madrugadas, compartilhando conhecimento e risadas (mais risadas do que conhecimento, mas tudo bem).

A Erton Almeida, meu amigo e companheiro, que me ajudou esse tempo todo. Que me incentiva sempre e embarca comigo nas minhas escolhas. Obrigada por tudo!

À Dulce Maria, que “encanta, colori e faz bem”.

À toda galera do LAPOA, especialmente à Candice de Leon e Mauro Saraiva, que sempre estão dispostos a me ajudar e tirar minhas dúvidas.

À Lusiana Farias, que me acolheu nos primeiros meses em Areia.

À Hellen Caroline, que conviveu comigo por muito tempo durante a graduação.

A todos orientadores que passaram na minha trajetória acadêmica, Prof.^a Dr.^a Marcia Miranda, Prof. Dr. Celso José e Prof.^a Dr.^a Ivia Carmem Talieri. Com certeza vocês contribuíram para minha evolução.

Aos meus professores da graduação, do ensino médio, e do ensino fundamental. Todos vocês fazem parte dessa conquista.

Aos técnicos, residentes e funcionários do Hospital Veterinário, que estão sempre dispostos a ajudar quando necessito.

Ao Centro de Ciências Agrárias, no qual passei meus últimos cinco anos; onde vivi coisas incríveis, e fiz muitos amigos, que vou levar pra vida toda.

Um agradecimento especial aos meus cães, Leão, Magnésio, Piaba, Jabá, Marilyn Monroe, Sherlock, Lady, Dutch Cow e Chacal (*in memoriam*), e a nova integrante da casa, a gatinha Julieta. Vocês me divertem, e afastam a tristeza e o estresse.

Por fim, agradeço à Universidade Federal da Paraíba e ao CNPq, que forneceram a estrutura e materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência dos hemoparasitas identificados pela reação em cadeia pela polimerase, em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB 07

Figura 2 - Frequência de infecções simples e mistas identificadas pela reação em cadeia pela polimerase em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB 08

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Tabela 1: Sequência de nucleotídeos correspondente aos primer utilizados nas reações em cadeia pela polimerase em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB 06
- Tabela 2** - Frequência dos hemoparasitas em infecções por um, dois ou três agentes pesquisados identificados pela reação em cadeia pela polimerase em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB..... 09
- Tabela 3** - Comparação dos resultados do exame de ponta de orelha com os resultados obtidos na PCR em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB 10

Resumo

FERNANDES, Magda, Universidade Federal da Paraíba, julho de 2017. **Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB.** Orientadora: Danila Barreiro Campos.

A anemia é uma alteração clínica e laboratorial de causas multifatoriais. Os hemoparasitas são considerados causadores de anemia por diversos mecanismos. O objetivo do trabalho foi identificar *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em animais com anemia atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Paraíba (UFPB). Foram selecionadas 95 amostras de sangue de animais anêmicos, as quais foram submetidas à extração de DNA e reações em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. A pesquisa direta de hemoparasita, quando solicitada pelo médico veterinário era realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário. Na PCR, foi identificado o *Hepatozoon* spp. em 67,3% dos animais, a *Babesia* spp. em 45,3%, a *E. canis* em 31,6% e a *A. platys* em 10,5% dos animais. Em 32,6% das infecções foi constatado o envolvimento de dois hemoparasitas. Infecção simultânea por três hemoparasitas foi identificada em 16,8% dos animais. A pesquisa direta de hemoparasitas apresentou resultados falsos-negativo e falsos-positivo em relação à PCR. O emprego da PCR contribuiu para o diagnóstico definitivo dos casos de hemoparasitoses nos animais atendidos no Hospital Veterinário da UFPB.

Palavras-chave: Erliquiose, Babesiose, Anaplasmosse, Hepatozoonose, PCR

Abstract

FERNANDES, Magda, Federal University of Paraíba, July 2017. **Molecular identification of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Hepatozoon* spp. in anemic dogs treated at the UFPB Veterinary Hospital.** View profile: Danila Barreiro Campos.

Anemia is a clinical and laboratory change in multifactorial causes. Hemoparasites are considered to cause anemia by several mechanisms. The objective of this work was to identify *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Hepatozoon* spp. in animals with anemia attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Paraíba (UFPB). A total of 95 blood samples were selected from anemic animals, which were submitted to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Hepatozoon* spp. Direct search for hemoparasite, when requested by the veterinarian, was performed at the Laboratory of Clinical Pathology of the Veterinary Hospital. In PCR, *Hepatozoon* spp. in 67.3% of the animals, *Babesia* spp. in 45.3%, *E. canis* in 31.6%, and *A. platys* in 10.5% of the animals. The involvement of two hemoparasites was found in 32.6% of the infections. Simultaneous infection by three hemoparasites was identified in 16.8% of the animals. Direct hemoparasite screening showed false-negative and false-positive PCR results. The use of PCR contributes to the definitive diagnosis of cases of hemoparasitosis in the animals treated at the Veterinary Hospital of the UFPB.

Keywords: Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis, Hepatozoonosis, PCR

SUMÁRIO

Artigo	01
Resumo	01
Abstract	02
Introdução	03
Material e métodos	05
Amostras	05
Extração de DNA e reação de PCR	05
Análise estatística	07
Resultados	07
Discussão	10
Conclusões	14
Referências	15
Anexos	19

O trabalho de conclusão de curso está sendo apresentado em forma de artigo segundo as normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Anexo 1).

Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB

Molecular identification of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Hepatozoon* spp. in anemic dogs treated at the UFPB Veterinary Hospital

Magda Fernandes^{1*}; Luíza Monteiro de Almeida¹; Maria da Conceição Gonçalves Macêdo¹; Cibely Cristina Nunes de Medeiros¹; Yathiaia Araújo Rolim¹; Danila Barreiro Campos¹

¹Departamento de ciências veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

Resumo

A anemia é uma alteração clínica e laboratorial de causas multifatoriais. Os hemoparasitas são considerados causadores de anemia por diversos mecanismos. O objetivo do trabalho foi identificar *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em animais com anemia atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Paraíba (UFPB). Foram selecionadas 95 amostras de sangue de animais anêmicos, as quais foram submetidas à extração de DNA e reações em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. A pesquisa direta de hemoparasita, quando solicitada pelo médico veterinário era realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário. Na PCR, foi identificado o *Hepatozoon* spp. em 67,3% dos animais, a *Babesia* spp. em 45,3%, a *E. canis* em 31,6% e a *A. platys* em 10,5% dos animais. Em 32,6% das infecções foi constatado o envolvimento de dois hemoparasitas. Infecção simultânea por três hemoparasitas foi identificada em 16,8% dos animais. A pesquisa direta de hemoparasitas apresentou resultados falsos-negativo e falsos-positivo em relação à PCR. O emprego da PCR contribuiu para o diagnóstico definitivo dos casos de hemoparasitoses nos animais atendidos no Hospital Veterinário da UFPB.

Palavras-chave: Erliquiose, Babesiose, Anaplasmoze, Hepatozoonose, PCR

Abstract

Anemia is a clinical and laboratory change in multifactorial causes. Hemoparasites are considered to cause anemia by several mechanisms. The objective of this work was to identify *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Hepatozoon* spp. in animals with anemia attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Paraíba (UFPB). A total of 95 blood samples were selected from anemic animals, which were submitted to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Hepatozoon* spp. Direct search for hemoparasite, when requested by the veterinarian, was performed at the Laboratory of Clinical Pathology of the Veterinary Hospital. In PCR, *Hepatozoon* spp. in 67.3% of the animals, *Babesia* spp. in 45.3%, *E. canis* in 31.6%, and *A. platys* in 10.5% of the animals. The involvement of two hemoparasites was found in 32.6% of the infections. Simultaneous infection by three hemoparasites was identified in 16.8% of the animals. Direct hemoparasite screening showed false-negative and false-positive PCR results. The use of PCR contributes to the definitive diagnosis of cases of hemoparasitosis in the animals treated at the Veterinary Hospital of the UFPB.

Keywords: Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis, Hepatozoonosis, PCR

*Autor para correspondência: Magda Fernandes
Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba
Rodovia PB-079, CEP: 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil.
Telefone: +5583996677032, e-mail: magda_fernandes.mf@hotmail.com

Introdução

A anemia é uma alteração hematológica caracterizada pela diminuição da massa de eritrócitos (volume globular), do número total de eritrócitos e do teor de hemoglobina abaixo dos valores de referência (LACERDA, 2015; KAHN & LINE, 2013; THRALL, 2014). Isoladamente, não constitui um diagnóstico, mas sim, uma alteração clínica e laboratorial, de causas multifatoriais (LACERDA, 2015). Para auxiliar o diagnóstico, a anemia é classificada de acordo com o tamanho dos eritrócitos e teor de hemoglobina, com a resposta da medula óssea e fisiopatogênese (THRALL, 2014).

De maneira geral, a anemia é decorrente de uma enfermidade primária que promova perda, destruição, e/ou diminuição da produção de hemácias. A perda de eritrócitos é causada por hemorragias agudas ou crônicas, como por exemplo, os traumas, procedimentos cirúrgicos, neoplasias hemorrágicas, lesões gastrointestinais, ectoparasitas e endoparasitas (LACERDA & HLAVAC, 2015; KAHN & LINE, 2013; THRALL, 2014).

A principal causa de destruição de hemácias, ou hemólise, acontece por mecanismos imunomediados. A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) pode ser de origem idiopática, ou estar relacionada a infecções, neoplasias e uso de certos fármacos (KAHN & LINE, 2013; THRALL, 2014). Além disso, infecções por parasitas de eritrócitos, administração de medicamentos ou substâncias que promovam lesões oxidativas levam à destruição das hemácias (LACERDA & HLAVAC, 2015; THRALL, 2014).

A diminuição da produção de hemácias acontece por aplasia de medula ou por aplasia ou hipoplasia eritrocitária. A aplasia de medula óssea pode ter origem primária, ou secundária a infecções, radiações, medicamentos ou produtos químicos. Nos casos de aplasia ou hipoplasia apenas da série vermelha do sangue, distúrbios extrínsecos à medula podem estar relacionados, como doenças inflamatórias, distúrbios endócrinos, insuficiência renal ou deficiência nutricional (KAHN & LINE, 2013; THRALL, 2014).

Os hemoparasitas são considerados importantes causadores de anemia em cães (COSTA, 2011), e podem causar alteração pela destruição direta dos eritrócitos, por aplasia de medula, ou desencadear anemia hemolítica imunomediada (THRALL, 2014). No Brasil, os principais hemoparasitas de cães são a *Ehrlichia canis*, a *Babesia* spp., o *Hepatozoon canis* e a *Anaplasma platys* (COSTA, 2011), sendo o carrapato do cão,

Rhipicephalus sanguineus, considerado o principal vetor desses parasitas (RAMOS et al., 2009; ROTONDANO et al., 2015; SOUSA et al., 2009; UENO et al., 2009).

O diagnóstico das hemoparasitoses pode ser feito através da visibilização de corpúsculos de inclusão no interior das células infectadas no exame de esfregaço sanguíneo, porém essa técnica, que é considerada eficiente apenas na fase aguda da doença, quando a parasitemia está alta (LEAL et al., 2015; SILVA MCA et al., 2014; UENO et al., 2009), apresenta baixa sensibilidade e especificidade, pois outros tipos de inclusões podem ser interpretadas como inclusões parasitárias (RAMOS et al., 2009; UENO et al., 2009; WITTER et al., 2013). Os testes sorológicos como o Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ou a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), são importantes ferramentas de diagnóstico, principalmente na fase crônica da infecção, no entanto, apenas afirmam a exposição ao agente, mas não confirmam a infecção (FONSECA et al., 2017); além disso, apresentam baixa especificidade, por causa das reações cruzadas com outros agentes e da presença de anticorpos de infecções anteriores (NAKAGHI et al., 2008). A identificação molecular desses hemoparasitas por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) é considerada o melhor método de diagnóstico das hemoparasitoses; pois apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada aos outros métodos (COSTA, 2011; MIRANDA, 2013; UENO et al., 2009; WITTER et al., 2013), além de permitir a identificação das espécies ou subespécies envolvidas na infecção (COSTA, 2011).

Considerando que a anemia é uma alteração hematológica encontrada comumente nas infecções por hemoparasitas em cães e a importância do diagnóstico preciso dessas enfermidades, o objetivo do trabalho foi identificar infecções por *E. canis*, *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *A. platys*, através da PCR, em animais com anemia atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Além disso, objetivou-se identificar coinfeções por outros hemoparasitas, e comparar os resultados da PCR com o exame parasitológico direto do esfregaço de sangue periférico, que pesquisa inclusões celulares compatíveis com os hemoparasitas.

Material e Métodos

Amostras

Os animais selecionados foram procedentes da rotina clínica do Hospital Veterinário da UFPB, localizado no município de Areia, Paraíba, Brasil. Amostras de sangue foram colhidas em tubos de polipropileno contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), na proporção de 20µl para 2 ml de sangue, encaminhadas, e processadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário. Foram selecionadas 95 amostras de animais que, no hemograma, apresentavam anemia segundo os valores de referência para volume globular, hematimetria e hemoglobina estabelecidos por Feldman et al. (2000). A pesquisa direta de hemoparasita, quando solicitada, foi realizada no próprio Laboratório de Patologia Clínica. Em seguida, as amostras de sangue foram congeladas à -80° C.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFPB sob protocolo nº 018/2017.

Extração de DNA e reação de PCR

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA por meio do G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Coréia), seguindo protocolo do fabricante. Após extração, o DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (Colibri Microvolume Spectrometer, Titertek-Berthold) e, em seguida, todas as amostras foram diluídas na concentração de 20ng/µl.

Os primers para os genes virB9 da *E.canis*, o qual é considerado um gene mais conservado que o p 30-10 e o 16S rRNA nesta espécie (FELEK et al. 2003), 18S rRNA do *Hepatozoon* spp., 18s rRNA da *Babesia* spp. e 16S do rRNA da *A. platys*, utilizados nas reações de PCR, foram obtidos a partir de estudos previamente publicados, conforme tabela 1. Como controle endógeno foi utilizada a tubulina beta (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos correspondente aos primer utilizados nas reações em cadeia pela polimerase em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. ► = forward; ◄ = reverse.

Gene alvo	Oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (pb)	Referência/ Número GenBank
<i>E. canis</i> (virB9)	► 5'-CATTATCATTTC AATACGTA ACTC-3'	959pb	Felek et al. 2003
	◄ 5'-TTTTGATTTTCTTCTGACATAGTG-3'		
<i>Babesia</i> spp. (18s rRNA)	► 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3'	551pb	Almeida et al. 2012
	◄ 5'-GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG-3'		
<i>Hepatozoon</i> spp. (18s rRNA)	► 5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3'	574pb	Almeida et al. 2012
	◄ 5'-ACAATAAAGTAAAAAACAYTTCAAAG-3'		
<i>A. platys</i> (16S rRNA)	► 5'-AAGTCGAACGGATTTTGTGC-3'	504pb	Gotsch et al. 2009
	◄ 5'-CTCTCCCGGACTCTAGTC-3'		
Tubulina Beta	► 5' -CAGCAAGATCCGTGAAGAGT -3'	123pb	BT030522.1
	◄ 5' -ACCAGCTGATGGACAGAGAG- 3'		

Nas reações de PCR utilizou-se 0.2 µM do primer forward e 0.2 µM do reverse, 200 µM de dNTPs (Eco Diagnóstica, Nova Lima, Brasil), 1X de Tampão de reação (Quatro G, Porto Alegre, Brasil), 2 mM de MgCl (Quatro G, Porto Alegre, Brasil), 0.625 unidades de Taq DNA Polimerase (Quatro G, Porto Alegre, Brasil), 80 (*E. canis* e Tubulina beta) ou 100 ng (*Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. e *A. platys*) de DNA genômico da amostra a ser avaliada, e água ultrapura Mili-Q, para completar o volume final de 25 µl.

As condições de amplificação foram semelhantes para todos os primers; começando com um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C para *E. canis*, 52°C para *Babesia* spp., 51°C para *Hepatozoon* spp. e 60°C para *A. platys* e Tubulina beta por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto, seguido de 1 ciclo de extensão final a 72°C durante 5 minutos. Como controle positivo foi utilizada uma amostra positiva para o agente na pesquisa de hemoparasitas em sangue periférico, previamente testada; e no controle negativo foi adicionada água ultrapura Mili-Q ao invés de DNA.

Após amplificação, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com Sybr™ (Biotium, Hayward, EUA), e revelados no fotodocumentador L-Pix Chem (Loccus, Cotia, Brasil).

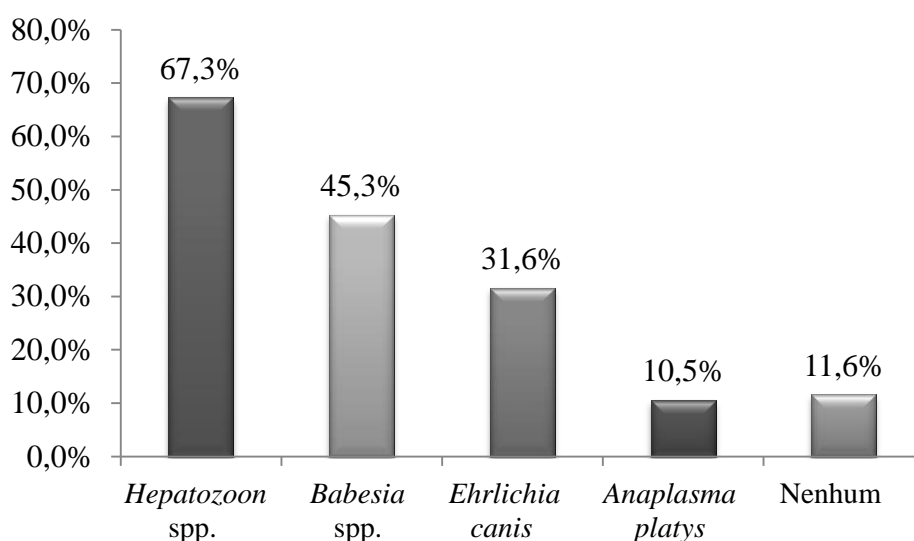
Análise estatística

Foi estabelecida a frequência absoluta e relativa dos hemoparasitas identificados nas análises de PCR; bem como o perfil de infecção por um, dois ou três hemoparasitas. Além disso, foram comparados os resultados obtidos por PCR, com dados da pesquisa de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo. Para auxiliar as análises, foi utilizado o software Microsoft Excel® 2010.

Resultados

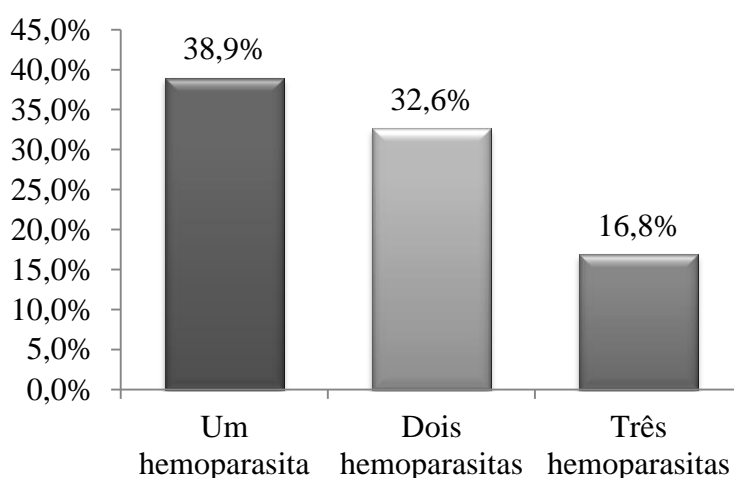
As análises de PCR indicaram que o hemoparasita mais prevalente nesta pesquisa foi o *Hepatozoon* spp., o qual foi identificado em 67,3% (64/95) das amostras analisadas. A *Babesia* spp. foi o segundo agente infeccioso mais encontrado, correspondendo à 45,3% (43/95). A bactéria *Ehrlichia canis* estava presente em 31,6% (30/95) dos animais avaliados, e em 10,5% (10/95) identificou-se DNA compatível com *Anaplasma platys*. Das 95 amostras testadas, 11,6% (11/95) não amplificaram DNA de nenhum hemoparasitas pesquisados (Figura 1).

Figura 1: Frequência dos hemoparasitas identificados pela reação em cadeia pela polimerase, em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.



Ao avaliar infecções concomitantes foi observado que 38,9% (37/95) dos animais apresentavam infecção apenas por um hemoparasita; 32,6% (31/95) foram positivos para dois e, 16,8% (16/95) das amostras apresentavam DNA compatível com três hemoparasitas distintos. Nenhuma das amostras testadas apresentava infecção pelos quatro hemoparasitas investigados (Figura 2).

Figura 2: Frequência de infecções simples e mistas identificadas pela reação em cadeia pela polimerase em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.



Dos animais que foram positivos apenas para um dos hemoparasitas estudados, o *Hepatozoon* spp. foi o mais prevalente, sendo responsável por 62,2% (23/37) das infecções simples; 21,6% (8/37) dos animais estavam infectados apenas por *Babesia* spp., e 16,2% (6/37) apresentavam infecção somente por *E. canis*. O *Anaplasma platys* não foi identificado como agente infeccioso único em nenhum dos animais avaliados. Das infecções concomitantes por dois agentes foi observado que 45,2% (14/31) dos animais estavam infectados por *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp.; 25,8% (8/31) por *Hepatozoon* spp. e *E. canis*; 19,4% (6/31) por *E. canis* e *Babesia* spp.; e 9,7% (3/31) por *Hepatozoon* spp. e *A. platys*. Entre os animais infectados por três hemoparasitas, 56,3% (9/16) foram positivos para *Hepatozoon* spp., *E. canis* e *Babesia* spp.; 37,5% (6/16) para *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. e *A. platys*, e 6,3% (1/16) para *Hepatozoon* spp., *E. canis* e *A. platys* (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência dos hemoparasitas em infecções por um, dois ou três agentes pesquisados identificados pela reação em cadeia pela polimerase em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.

Hemoparasitas identificados	Número de animais positivos	% de animais positivos
<i>Hepatozoon</i> spp.	23	62,2%
<i>Babesia</i> spp.	8	21,6%
<i>Ehrlichia canis</i>	6	16,2%
Total	37	100%
<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Babesia</i> spp.	14	45,2%
<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>E. canis</i>	8	25,8%
<i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> spp.	6	19,4%
<i>Hepatozoon</i> spp. e <i>A. platys</i>	3	9,7%
Total	31	100%
<i>Hepatozoon</i> spp., <i>E. canis</i> e <i>Babesia</i> spp.	9	56,3%
<i>Hepatozoon</i> spp., <i>Babesia</i> spp. e <i>A. platys</i>	6	37,5%
<i>Hepatozoon</i> spp., <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	1	6,3%
Total	16	100%

A pesquisa direta de hemoparasitas no esfregaço de sangue periférico, foi solicitado em 60% dos animais (57/95). Destes, 51% (29/57) foram positivos para um ou mais agentes, e em 49% (28/57) não foi visualizado estruturas compatíveis com nenhum parasita. Para os outros 40% (38/95) dos animais avaliados por PCR o exame não foi solicitado.

Ao comparar os resultados da PCR com a pesquisa direta de hemoparasitas, foi observado que 13 animais apresentaram estruturas semelhantes a mórulas de *Ehrlichia* spp., no entanto, seis (46,2%) destas amostras foram confirmadas na PCR para o agente; as outras sete (53,8%) amostras que não foram confirmadas para *E. canis* na PCR, apresentaram DNA compatível com outros hemoparasitas. Observou-se que 10 animais apresentaram inclusões nos eritrócitos sugestivas de *Babesia* spp.; dessas amostras, 50% apresentaram resultado positivo na PCR, e em alguns casos havia co-infecção por outros agentes. Das cinco (50%) amostras negativas para *Babesia* spp. na PCR, 80% (4/5) foram positivas para outros agentes, e em 20% (1/5) não foi identificado nenhum hemoparasita pesquisado. *Hepatozoon* spp. foi visualizado no sangue periférico de sete animais, dos quais 86% (6/7) foram confirmados para o agente na PCR, e ainda, apresentaram DNA compatível com outros hemoparasitas. Apenas uma amostra (14%) não foi confirmada para *Hepatozoon* spp., na qual foi identificado DNA correspondente a *Babesia* spp. Estruturas

semelhantes à *Anaplasma* spp. foram observadas no sangue periférico de três animais, no entanto, nenhuma dessas amostras foram confirmadas para o agente na PCR. Nesses animais foram identificados outros agentes infecciosos causando infecção (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação dos resultados do exame de ponta de orelha com os resultados obtidos na PCR em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. E = *Ehrlichia canis*; B= *Babesia* spp.; H= *Hepatozoon* spp.; A = *Anaplasma platys*; HE= *Hepatozoon* spp e *E. canis*; EB= *E. canis* e *Babesia* spp.; HB = *Hepatozoon* spp e *Babesia* spp.; HA= *Hepatozoon* spp e *A. platys*; HEA= *Hepatozoon* spp, *E. canis* e *A. platys*; HEB= *Hepatozoon* spp, *E. canis* e *Babesia* spp.; HBA= *Hepatozoon* spp, *Babesia* spp. e *A. platys*; Neg. = negativo.

Agentes pesquisados	Nº de amostras positivas em lâmina	Outros agentes identificados/ Nº de amostras confirmadas para o agente na PCR	Outros agentes identificados/ Nº de amostras não confirmadas para o agente na PCR
<i>E. canis</i> *	13	HE, E, HEA, EB, HEB, HE = 6 (46,2%)	B, B, H, HBA, HBA, H, HBA = 7 (53,8%)
<i>Babesia</i> spp.	10	B, HBA, HEB, HB, B = 5 (50%)	H, HE, HEA, H, Neg. = 5 (50%)
<i>Hepatozoon</i> spp.	7	HB, HEB, HB, HB, H, HA = 6 (86%)	B = 1 (14%)
<i>A. platys</i>	3	-	H, HEB, EB = 3 (100%)

* Outras espécies de *Ehrlichia* spp.

Discussão

Assim como nesta pesquisa, infecções por hemoparasitas já foram relatadas em animais com anemia (DRUMOND, 2013; FONSECA et al., 2017; ROTONDANO et al., 2015; SILVA et al., 2012; SPOLIDORIO et al., 2011).

O hemoparasita mais prevalente nesta pesquisa foi o *Hepatozoon* spp. Estudos anteriores também identificaram esse hemoparasita em cães com anemia (DRUMOND, 2013; MUNDIM et al., 1992; SPOLIDORIO et al., 2011). Spolidorio et al. (2011) verificaram por PCR que 90% dos animais avaliados apresentavam infecção por

Hepatozoon spp. em Cuiabá. No entanto, Rotondano et al. (2015) ao pesquisar infecções por hemoparasitas no semiárido da Paraíba, não identificaram animais positivos para *Hepatozoon* spp., utilizando o mesmo método de diagnóstico. A identificação deste hemoparasita no município de Areia pode estar relacionada às diferenças de susceptibilidade do *R. sanguineus* ao *Hepatozoon* spp., pois no Brasil há relatos de pelo menos dois halotipos dessa espécie de carrapato (MORAES-FILHO et al., 2011), o qual é apontado como principal vetor da hepatozoonose (TORRES et al., 2004). Além disso, outras espécies de carrapatos podem estar envolvidas na transmissão desse patógeno principalmente em áreas rurais (MIRANDA, 2013).

A maior prevalência de infecções por *Hepatozoon* spp. pode estar associada à procedência dos animais atendidos no Hospital Veterinário, pois muitos destes residem em zonas rurais. Estudos recentes constataram que animais da zona rural apresentavam maior infestação por carrapatos quando comparado aos animais que vivem na área urbana, favorecendo a transmissão de doenças veiculadas por este vetor (SILVA MCA et al., 2014). Silva MCA et al. (2014) verificaram que o *Hepatozoon* spp. foi o agente infeccioso mais prevalente na pesquisa direta de hemoparasitas em animais provenientes da zona rural de Abadias dos Dourados, Minas Gerais.

A *Babesia* spp. foi identificada como o segundo parasita mais prevalente nos animais deste estudo. A presença de *Babesia* spp. em animais anêmicos já foi relatada em pesquisas anteriores (DRUMOND, 2013; FONSECA et al., 2017; SPOLIDORIO et al., 2011). Resultados inferiores ao observado, foram encontrados por Ramos et al. (2010) no Recife, Rotondano et al. (2015) no semiárido da Paraíba e por Silva et al. (2016) no Recife, que identificaram *Babesia canis vogeli* em respectivamente 7,3%, 10% e 4,8% dos animais avaliados, por meio da PCR. Diferentes frequências podem ser observadas devido às diferenças nas populações de cães estudadas (SILVA et al., 2016); neste trabalho, a população avaliada era composta por cães anêmicos, e isso pode ter contribuído para a maior identificação da *Babesia* spp., visto que esse protozoário causa anemia devido à hemólise intravascular ou extravascular (DRUMOND, 2013).

A associação do quadro de anemia com a erliquiose é relatada em vários estudos (DRUMOND, 2013; FONSECA et al., 2017; ROTONDANO et al., 2015; SILVA et al., 2012; SOUSA et al., 2009; WITTER et al., 2013). O resultado observado nesse trabalho foi inferior ao encontrado por Ramos et al. (2009), que observaram prevalência de 57% para *E. canis*, no Recife, utilizando a PCR; e superior ao encontrado por Rotondano et al. (2015), os quais relataram que 25% do animais avaliados apresentaram infecção por *E.*

canis, associando a infecção pelo hemoparasita ao quadro de anemia. Esses índices de prevalência podem variar de acordo com as populações de cães estudadas, com as diferenças geográficas, ou de fatores outros como distribuição dos vetores e método de diagnóstico utilizado (SOLANO-GALLEGO et al., 2006).

Em menor frequência foi identificada a bactéria *A. platys* (10,5%). Resultado semelhante foi observado por Witter e colaboradores (2013), que encontraram prevalência de 9,1% para este parasita em Cuiabá, por meio da PCR. Contudo, Ramos et al. (2010) verificaram que 48,7% dos animais avaliados no Recife, apresentavam infecção por *A. platys*. No presente estudo, a *A. platys* não foi identificada como agente único causando infecção nos animais avaliados, isso pode indicar que a anaplasmose é uma enfermidade pouco frequente nessa microrregião. Todavia, deve-se considerar que a baixa prevalência de *A. platys* pode está relacionada à característica do agente apresentar episódios cíclicos parasitemia e, nos períodos em que há poucas inclusões plaquetárias a reação de PCR pode ser negativa (CHANG & PAN, 1996). Além disso, o perfil dos animais avaliados, cuja principal alteração considerada era a presença de anemia, pode ter influenciado na menor identificação do agente; uma vez que e a infecção por *Anaplasma platys* está associada principalmente ao desenvolvimento de trombocitopenia (CHANG & PAN, 1996; SILVA et al, 2012).

Alguns animais não apresentaram reações positivas para os hemoparasitas pesquisados. Isso pode ser explicado pelo fato da pesquisa ser realizada em animais anêmicos, independente da suspeita de hemoparasitose. Desta forma, a anemia apresentada por estes animais pode ser atribuída a causas distintas como neoplasias, doença renal crônica, doenças inflamatórias, outras doenças infecciosas como cinomose, parvovirose e leishmaniose, ou ainda, por distúrbios nutricionais (ABREU-SILVA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; CRIVELLENTI et al., 2014; DRUMOND, 2013; SILVA AHC et al., 2014; THRALL, 2014).

Na maioria dos casos de hemoparasitose, um único agente é responsável pela infecção e por desencadear os sinais clínicos. Nesta pesquisa, 38,9% dos animais apresentaram infecção por um dos agentes, o que também foi observado por Silva et al. (2012) em 24,61% dos animais, no Paraná, utilizando a PCR.

No entanto, apesar da maioria das infecções serem causadas por um hemoparasita, as infecções mistas podem ser encontradas (COSTA, 2011; ROTONDANO et al., 2012;

SILVA et al., 2012; SPOLIDORIO et al., 2011; WITTER et al., 2013). Coinfecções por dois hemoparasitas identificados pela PCR, já foram relatadas por Spolidorio et al. (2011) em Cuiabá, por Kledmanee et al. (2009) na Tailândia, por Costa (2011) em Goiânia, por Fonseca et al (2017) em Lavras, e por Rotondano et al (2015) no semiárido da Paraíba. Infecções mistas envolvendo três agentes distintos também foram observadas, através da PCR, por Costa (2011), por Oliveira (2015) em Viçosa, e por Kledmanee et al. (2009) na Tailândia. Essas coinfecções podem ser atribuídas ao fato desses hemoparasitas compartilharem o mesmo vetor (COSTA, 2011; ROTONDANO et al., 2015), o qual pode disseminar simultaneamente vários parasitas (LEAL et al., 2015); essas infecções múltiplas exacerbam os sinais clínicos e as alterações laboratoriais (SOUSA et al., 2009), dificultando a suspeita clínica (LEAL et al., 2015). A associação de dois ou mais hemoparasitas torna o diagnóstico mais complexo, e o diagnóstico por PCR é uma ferramenta que possibilita identificar com eficiência qual ou quais agentes estão envolvidos na infecção.

A comparação entre os dois métodos de diagnóstico das hemoparasitoses revelou que a pesquisa direta do hemoparasita em sangue periférico apresenta muitos resultados falsos negativo. Apesar do baixo custo, a pesquisa direta de hemoparasita é considerada um método de diagnóstico de baixa sensibilidade (ARAUJO, 2015; COSTA, 2011; RAMOS et al., 2009; ROTONDANO et al., 2015; UENO et al., 2009); sendo a PCR, um método mais sensível para diagnosticar infecções por hemoparasitas (COSTA 2011; RAMOS et al., 2009).

No presente trabalho também foi identificado que 48,5% dos resultados positivos em lâmina não foram confirmados para o agente na PCR. Resultados falso-positivos, na pesquisa direta de hemoparasita, foram encontrado por Ramos et al. (2009) no Recife, e por Ueno et al. (2009) em Botucatu. Nas amostras cujo agente visualizado no esfregaço sanguíneo não foi confirmado na PCR, foram identificados outros hemoparasitas. Ramos et al. (2009) observaram em suas análises que 3% dos animais positivos em lâmina para *A. platys* não foram confirmados para esse agente na PCR, mas foram positivos para *E. canis*. Inclusões celulares podem ser provenientes da ativação celular nos processos inflamatórios, e muitas vezes podem ser confundidas com inclusões parasitárias; ou ainda, inclusões de um parasita podem ser semelhantes a corpúsculos de inclusão de outros hemoparasitas, possibilitando a conclusão de diagnósticos falso-positivos (RAMOS et al., 2009). É necessário considerar ainda, o envolvimento de outras espécies de da família

Anaplasmataceae, que podem apresentar no esfregaço de sangue estruturas semelhantes à *Ehrlichia canis* (FERREIRA et al., 2007) e, pelo fato dos iniciadores utilizados neste trabalho serem específicos para essa espécie, o resultado da PCR foi negativo para este agente. O diagnóstico definitivo e confiável dessas enfermidades por meio de PCR é fundamental para a conduta terapêutica, e assim evitar o uso desnecessário de antibióticos e antiparasitários.

Conclusões

A partir dos resultados encontrados é possível afirmar que a anemia está presente na maioria dos casos de hemoparasitoses em cães, e às vezes, dois ou mais parasitas estão envolvidos na infecção.

A hepatozoonose é uma enfermidade muito frequente em animais anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB. A erliquiose e a babesiose também são identificadas com frequência nos animais com anemia; já a anaplasmosose parece não ser uma enfermidade importante nos animais que apresentam anemia, mas pode ser encontrada em muitos casos de co-infecções.

A PCR é uma importante ferramenta no diagnóstico das hemoparasitoses, auxiliando na identificação de coinfeções e contribuindo, para que seja instituído o tratamento mais adequado para o agente identificado.

Referências bibliográficas

Abreu-silva AL, Lima TB, Macedo AA, Moraes-Júnior FJ, Dias EL, Batista ZS. et al. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008, 17 (1): 197-203.

Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, et al. *Coxiella symbiont* in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3(4): 203-206.

Almeida RK, Vasconcelos AC, Carneiro RA, Paes PRO, Moro L. Alterações citológicas do sangue periférico e da medula óssea de cães com cinomose. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009, 61 (6): 1255-1260.

Araujo AC, Silveira JAG, Azevedo SS, Nieri-Bastos FA, Ribeiro MFB, Labrun AMB, et al. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2015, 35(5): 456-461.

Chang WL, Pan MJ. Specific Amplification of *Ehrlichia platys* DNA from Blood Specimens by Two-Step PCR. *J clin microbiol* 1996; 34 (12): 3142–3146.

Costa HX. *Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia* [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2011.

Crivellenti SB. *Fatores indutores e supressores da eritropoiese em caninos doentes renais crônicos* [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual de São Paulo; 2015.

Drumond MRS. *Ocorrência, classificação e fatores de risco de anemia em cães* [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2013.

Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. Oxford: Blackwell Publishing; 2000.

Felek S, Huang H, Rikihisa Y. Sequence and Expression Analysis of virB9 of the Type IV Secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. *Infect Immun* 2003; 71 (10): 6063-6067.

Ferreira RF, Cerqueira AMF, Pereira AM, Guimarães CM, Garcia de Sá A, Abreu FS et al. *Anaplasma platys* Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. *Intern J Appl Res Vet Med* 2007. 5 (3): 113-119.

Fonseca JP, Bruhn FRP, Ribeiro MJM, Hirsch C, Rocha CMBM et al. Hematological parameters and seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs. *Cienc anim bras* 2017; 18 (1-9): 36095.

Gotsch S, Leschnik M, Duscher G, Burgstaller JP, Wille-Piazzai W, Joachim A. Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. *Vet Parasitol* 2009; 166(1-2): 171-174.

Khan CM, Line S. *Manual Merck de veterinária*. São Paulo: Roca; 2013.

Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, Chatsiriwech J, Suksai P, Suwannachat P et al. Phingphol charoonrut and kridsada chaichoun development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40 (1): 35 -39.

Lacerda LA. Anemias / Avaliação Clínica e Laboratorial. In Jericó MM, Kogika MM, Andrade Neto JP. *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. 1ª ed. Rio de Janeiro : Roca; 2017

Lacerda LA, Hlavac NRC. Anemias Regenerativas. In Jericó MM, Kogika MM, Andrade Neto JP. *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. 1ª ed. Rio de Janeiro : Roca; 2017.

Leal PDSA, Moraes MIMR, Barbosa LLO, Lopes CWG. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro. *Brasil Rev Bras Med Vet* 2015; 37(1): 55-62.

Miranda RL. *Prevalência e caracterização molecular da espécie de Hepatozoon e parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães (Canis familiaris) naturalmente infectados procedentes da microrregião de Uberlândia – MG* [Tese]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2013.

Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastosa FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the Rhipicephalus sanguineus group in Latin America. *Acta Trop* 2011; 117 (2011): 51–55.

Mundim AV, Jacomini JO, Mundim MJS, Araújo SF. *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais: relato de dois casos. *Braz J vet Res anim Sri* 1992; 29: 359-361.

Nakaghi ACH, Machado RZ, Costa MT, André MR, Baldani CD. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, serológicos e moleculares. *Cienc Rural* 2008; 38 (3): 1-5.

Oliveira AC. *Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia molecular, alterações hematológicas e centrifugação por gradiente* [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2015.

Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FR, Guedes Junior DS, Souza IIF, Ono TM et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009, 18 (1): 58-62.

Ramos R, Ramos C, Araújo F, Oliveira R, Souza I, Pimentel D et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol Res* 2010; 107 (2010):1115–1120.

Rotondano TEF, Almeida AMP, Lustosa EMC, Cordeiro AA, Camboim EKA, Azevedo SS et al. An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 1-6.

Rotondano TEF, Almeida HKA, Krawczak FS, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB. et al. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2015, 24 (1): 52-58.

Silva AHC, Silva DM, Ribas CR, Dittrich RL, Dornbusch PT, Guérios SD. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. *Cienc anim bras* 2014, 15 (1): 87-92.

Silva GCF, Benitez NA, Giroto A, Taroda A, Vidotto MC, Garcia JL et al. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Paraná. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21 (4): 379-385.

Silva MCA, Mundim AV, Mendonça GA, Mundim MJS, Guimarães EC. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. *Biosci J* 2014; 30 (2): 892-900.

Silva VCL, Lima ER, Dias MBMC, Fukahori FLP, Rêgo MSA, Pinheiro Júnior JW. Parasitological and molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs of Recife, Pernambuco and evaluation of risk factors associated. *Semin: Cien Agrar* 2016; 37 (1): 163-172.

Solano-Gallego L, Llull J, Osso M, Hegarty B, Breitschwerdt E. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet. Res.* 2006, 37 (2006): 231–244.

Sousa VRF, Bomfim Tcb, Almeida ABPF, Barros LA, Sales KG, Justino CHS et al. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. *Acta Sci Vet* 2009; 37(3): 281-283.

Spolidorio MG, Torres MT, Campos WND, Melo ALT, Igarashi M, Amude AM et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20 (3): 253-255.

Thrall MA. Anemia não regenerativa. In: Thrall MA, Weiser G, Allinson RW, Campbell TW. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.

Thrall MA. Anemia regenerativa. In: Thrall MA, Weiser G, Allinson RW, Campbell TW. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.

Thrall MA. Classificação e abordagem diagnóstica da anemia. In: Thrall MA, Weiser G, Allinson RW, Campbell TW. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.

Torres FD, Figueiredo LA, Faustino MAG. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Parasitol* 2004, 13 (4): 151-154.

Ueno TEH, Aguiar DM, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Ribeiro MG, Paes AC. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18 (3): 57-61.

Witter R, Vecchi SN, Pacheco TA, Melo ALT, Borsa A, Sinkoc AL et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. *Semin: Cien Agrar* 2013; 34 (6): 3811-3822.

ANEXO 1

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

“BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PARASITOLOGY”

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

APRESENTAÇÃO

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral. O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta, responsabilizando-se por todo o processo de tramitação e originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 2 revisores anônimos, sendo um estrangeiro, selecionados pelo editor-chefe. Em caso de pareceres contrários, o artigo será enviado a um terceiro revisor. A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Comunicação Breve e Artigos de Revisão, sendo este último escrito por especialistas e

condicionado a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos assistentes.

Submissão de trabalhos:

O artigo a ser submetido deve passar por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV (http://cbpv.org.br/rbpv/revisoes_traducoes.php). Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês. Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão. Caso um dos coautores seja estrangeiro nativo da língua inglesa, este deverá revisar o inglês do trabalho e enviar um ofício à RBPV.

Taxa de publicação:

Após o aceite do artigo, será cobrada as seguintes taxas de publicação:

R\$ 250,00 (associados do CBPV em dia com as anuidades);

R\$ 500,00 (não-associados do CBPV).

Dados bancários para depósito:

Nome: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária/ Revista

Banco do Brasil (001)

Agência: 0269-0

Conta Corrente: 28848-9

Para autores estrangeiros:

SWIFT BRASBRRJRPO

IBAN 001026900000288489

Endereço: Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural. CEP: 14884-900.

Jaboticabal – SP, Brasil.

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos

Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator ad-hoc. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 2 revisores anônimos, sendo um estrangeiro, selecionados pelo editor-chefe. Em caso de pareceres contrários, o artigo será enviado a um terceiro revisor.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá(ão) os formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário. Após o aceite pelos revisores ad-hocs, porém antes da resposta aos autores, o artigo passará pela análise final de um dos Editores Científicos Assistentes. Lembrando que, o Editor Científico Assistente possui autonomia para sugerir correções e/ou rejeitar a publicação do artigo, mesmo com a aprovação dos relatores.

Após diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe da revista, fazem as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, em que o autor se responsabiliza por todo o processo de tramitação e originalidade do trabalho.

ÉTICA

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.

APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte “Times New Roman”, tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 17 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Comunicação Breve, o trabalho não deverá exceder 6 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Os trabalhos submetidos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa

credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo) e Referências Bibliográficas. As Comunicação Breve obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa categoria, o artigo submetido só será aceito desde que possua alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente, atribuindo ao Editor-chefe a continuidade da submissão ou não.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 18 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

“Abstract” e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explanação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras "a", "b", "c", etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

Livros

Levine JD. Veterinary protozoology. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667- 680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of Rhipicephalus (Boophilus) microplus in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araujo MM. Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação

Paim e Souza (2011) ou (PAIM & SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de "et al." e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.