

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* spp. EM CÃES DE AMBIENTE URBANO E RURAL DA MESORREGIÃO DO LESTE MARANHENSE, MICRORREGIÃO DE CHAPADINHA-MA, BRASIL.

Andréa Pereira da Costa

São Luís – MA

2011

Andréa pereira da Costa

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* spp. EM CÃES DE AMBIENTE URBANO E RURAL DA MESORREGIÃO DO LESTE MARANHENSE, MICRORREGIÃO DE CHAPADINHA-MA, BRASIL.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra – UEMA

São Luís – MA

2011

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1º Membro

Profa. Dra. Rita de Maria Seabra N.C. Guerra – UEMA
(Orientadora)

2º Membro

Prof. Dr. Maurício Cláudio Horta- UNIVASF

3º Membro

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo- UEMA

*Ao meu esposo, **Francisco**, que me dispensou todo apoio, carinho proporcionando força e encorajamento desde o início dessa caminhada até sua conclusão. E a minha querida avó **Ana Araújo** (in memória) que foi muitas vezes âncora na minha vida e que hoje é uma estrela de muita luz.*

“O Cristo não pediu muita coisa, não exigiu que as pessoas escalassem o Everest ou fizessem grandes sacrifícios. Ele só pediu que nos amássemos uns aos outros.”

Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto, quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar.

Chico Xavier

Agradecimentos

À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para concluir mais uma etapa da minha vida.

À Professora Doutora Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra por gentilmente ter aceitado ser minha orientadora, se constituindo em uma amiga, incentivando-me na conquista deste ideal, por todo apoio, confiança e pelas valiosas contribuições e a suavidade com que me conduziu no resultado desse trabalho, que enriqueceram não só a dissertação mas me deu ensinamentos pra toda vida. A Senhora dedico meu carinho, reconhecimento, respeito, admiração e gratidão. Como sentirei sua falta...

Ao meu esposo Francisco pelo amor, apoio e companheirismo, compreensão e dedicação que motivaram o cumprimento de mais esta etapa em nossas vidas. Agradeço por ter ficado ao meu lado em todos os momentos de dificuldade, sendo minha âncora. A você, dedico todo o meu amor, carinho e respeito.

Ao meu irmão gêmeo André incentivando-me na conquista deste ideal, por todo apoio e confiança.

À toda minha família do Lar Pousado da Esperança, em especial: Mariana, Carlinha, Danielle, Valéria e Marquito que sempre se fizeram presentes durante todo esse tempo. Com afeto e respeito lhes dedico minha gratidão.

À minha família “de verdade” que mesmo pelo pouco tempo de convívio já consigo amá-los tanto: minha mãe Antonia, e meus irmãos Cristiano, Elizângela, Dilciane e Alex.

Aos meus sogros Fagunda e Galdino e aos meus cunhados, Suene, Fagno, Antonio Filho e Costa- Neto que são a minha família do coração hoje e sempre.

Ao prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior e a sua equipe da UFMA –Chapadinha. Obrigado pelo auxílio, pois sem a ajuda de vocês o trabalho seria mais difícil.

Ao Prof. Dr. Livre Docente Marcelo Bahia Labruna, da Universidade de São Paulo, pelo carinho com que me recebeu no VPS e por toda ajuda na realização deste trabalho, pois parte deste estudo não teria sido possível sem seu apoio técnico-científico.

Aos amigos que fiz no Laboratório “Carrapatos” do VPS da USP pelo agradável período que passamos juntos: Jonas, João, Herbeth, Fernanda, Thiago, Aline, Aline Diniz, Amália, Matias, Mariana, Flavinho, Renatinho e em especial a querida amiga Lara, por terem cedido parte do seu tempo para me proporcionar orientações e auxílio na realização dos testes, além de me ajudarem a trabalhar e a viver em São Paulo.

À doutoranda, minha grande amiga, Jocy Cortez de Sá pela forma carinhosa e solidária com que me tratou desde que nos conhecemos. Você foi e será

presença marcante em minha vida. Agradeço pelo ombro e palavras de incentivo nas horas mais difíceis da minha vida.

À amiga doutora Solange Melo, por ter sido presente, prestativa e companheira, por todos os momentos divertidos e difíceis que passamos juntas. Obrigada por tornar esse mestrado inesquecível! Vou sentir muito sua falta!

À minha maravilhosa turma do Mestrado: Ylisieux, Joicy, Lucélia, Júlia, Lidiane - pela nossa amizade, pelo compartilhamento de decisões e angústias e, sobretudo, por me mostrarem que a vida pode ser leve e apaixonante; José Manoel, Erico, Herlon e Fernando pelo convívio, troca de experiências, momentos que só me fizeram crescer.

Aos amigos Carlos e Elaine/ EMBRAPA GADO DE CORTE/ MS. Agradeço muitíssimo pela paciência em tirar as muitas dúvidas, pelo apoio e incentivo sempre e por terem cedido os controles pra fazer a PCR.

Ao grupo de Parasitologia da Universidade Estadual do Maranhão: Verônica, Arannádia, Gabriel, Sâmara, Giovani, Halliny, Francisco e Luanna. Melhor grupo de estudo da UEMA.

À Professora Doutora Alcina Vieira de Carvalho Neta pela disponibilidade e pelo apoio prestado na análise das questões técnicas.

À professora Doutora Ana Clara Gomes dos Santos. Guardarei na memória os seus ensinamentos, sua força, determinação e ética. No coração guardarei a gratidão e respeito.

À professora Doutora Ana Lúcia Abreu Silva, obrigada por todo incentivo e apoio, por ter acreditado em mim durante essa jornada.

Aos Amigos Vivian e Tom. Foi muito bom ter conhecido vocês, melhor ainda foi ter convivido com vocês, obrigada pela amizade constituída.

À amiga Carol Romão por sempre estar disposta a me ajudar quando mais precisei durante o mestrado.

À Capes e a FAPEMA pela bolsa de apoio que viabilizou a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual do Maranhão por contribuir novamente em mais uma etapa da minha formação profissional.

À todos que depositaram algo nesse trabalho: Discussões e leituras incessantes, sorrisos, abraços, olhares de apoio, incentivo, palavras e todas as outras pessoas, não menos importantes, que passaram por minha vida deixando um pouco de si e levando um pouco de mim.

Meu muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1-Carrapatos	22
2.2- <i>Babesia canis</i>	25
2.3- <i>Ehrlichia canis</i>	29
2.4- <i>Rickettsia</i> sp.	33
3 OBJETIVOS	40
3.1- Geral	40
3.2- Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Caracterização da área	41
4.2 Coleta e identificação dos carrapatos	41
4.3 Amostragem e coleta de sangue	42
4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	42
4.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia canis</i>	42
4.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i>	42
4.4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Rickettsia</i> spp.	43
4.5 Extração do DNA do sangue	43
4.6 Padronização da PCR convencional	43
4.6.1 Oligonucleotídeos Iniciadores para <i>Babesia canis vogeli</i> e <i>Rickettsia</i> spp.	44
4.6. 2 Análises dos produtos amplificados	45
4.7- Pesquisa de <i>Rickettsia</i> spp. nos carrapatos	45
4.7.1 Extração de DNA dos carrapatos	45
4.7.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	46
4.7.3 Análises dos produtos amplificados	46
4.7.4 Purificação e Seqüenciamento de Nucleotídeos	47

4.8 Preenchimento do questionário	47
4.9 Análise estatística	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Caracterização da população canina da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha- MA.	48
5.2 Carrapatos	49
5.3 Imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Babesia canis</i>	54
5.4 Imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i>	58
5.5 Imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Rickettsia</i> spp.	62
5.6 Co-soropositividade e co-soronegatividade para <i>B. canis</i> e <i>E. canis</i> .	71
5.7 Co-soropositividade e co-soronegatividade para <i>E. canis</i> e <i>Rickettsia</i> spp.	72
5.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	73
5.8.1 PCR para <i>B. canis vogeli</i>	73
5.8.2 PCR de sangue para <i>Rickettsia</i> spp.	75
5.8.3 PCR dos carrapatos para <i>Rickettsia</i> spp.	76
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	100

LISTAS DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha com atividade de caça, no período de março de 2010.	49
TABELA 2- Carrapatos identificados em cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha, no período de março de 2010.	50
TABELA 3- Tipo de infestação por carrapatos em cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	52
TABELA 4- Atividade de caça exercida pelos cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	53
TABELA 5- Frequência de anticorpos anti – <i>Babesia canis</i> em soros de cães na área urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	54
TABELA 6- Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária e grupo racial em cães soropositivos para <i>Babesia canis</i> da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	57
TABELA 7- Frequência de anticorpos anti – <i>Ehrlichia canis</i> em soros de cão na área urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	59
TABELA 8- Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária e grupo racial em cães soropositivos para <i>Ehrlichia canis</i> da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	61
TABELA 9- Frequência de anticorpos anti – <i>Rickettsia</i> spp. em soros de cães nos municípios de Anapurus, Chapadinha e Mata Roma, Maranhão, Brasil.	64
TABELA 10- Imunofluorescência Indireta para <i>Rickettsia</i> spp., em cães do município de Anapurus, Maranhão, Brasil.	65
TABELA 11- Imunofluorescência Indireta para <i>Rickettsia</i> spp., em cães do município de Chapadinha, Maranhão, Brasil.	66
TABELA 12 - Imunofluorescência Indireta para <i>Rickettsia</i> spp., em cães do município de Mata Roma , Maranhão, Brasil.	67

TABELA 13 Freqüência de anticorpos anti – <i>Rickettsia</i> spp. em soros de cães na área urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	69
TABELA 14- Freqüência de anticorpos anti – <i>Rickettssia</i> spp. em soros de cães na área urbana e rural no Município de Chapadinha no período de março de 2010.	69
TABELA 15- Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária, grupo racial e atividade de caça em cães soropositivos para <i>Rickettsia</i> spp. da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	71
TABELA 16- Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i> .	72
TABELA 17- Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de <i>E. canis</i> e <i>Rickettsia</i> spp.	73

LISTA DE FIGURA

	Pé
FIGURA 1- Mapa de localização dos municípios Chapadinha, Anapurus e Mata Roma – MA.	41
FIGURA 2- Freqüência de anticorpos anti- <i>Babesia canis</i> em soros de cães (n=322), da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	56
FIGURA 3- Freqüência de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> em soros de cães (n=322), da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.	60
FIGURA 4- PCR convencional, usando iniciadores BAB1/BAB4, específicos para <i>Babesia canis vogeli</i> . 1, 2 e 3 – Amostras positivas com amplificado de 590 pb.	74

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

PCR – Polimerase Chain Reaction – (Reação em cadeia de polimerase)

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay(Ensaio de imunoadsorção enzimática)

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

IC – Intervalo de Confiança

p – nível de significância

OR – Odds Ratio

SRD – Sem raça definida

DNA- ácido desoxirribonucléico

DNTPs- desoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA -ácido etileno-diamino-tetracético

FMB- febre maculosa Brasileira

GFM- Grupo da Febre Maculosa

GT- Grupo do Tifo

Pb- pares de bases

pH - potencial hidrogeniônico

primer- oligonucleotídeo iniciador

pg - picogramas, 10⁻¹² gramas

Taq - *Termophilus aquaticus*

TBE - tris-borato EDTA

T_m - temperaturas de anelamento

RMSF- Rocky Mountain Spotted Fever

OmpA = *Outher membrane protein A* - proteína externa de membrana A

g = grama

µg = micrograma

mL = mililitro

COSTA, A. P. **Aspectos epidemiológicos de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* sp. em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do leste Maranhense, microrregião de Chapadinha-MA, Brasil.** [Epidemiological data of *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban and rural environment from Chapadinha, east region of Maranhão- Brazil] . 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

RESUMO

Infecções por *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* spp. podem causar doenças importantes na clínica de pequenos animais. Além disso, são de interesse em saúde pública, devido ao potencial zoonótico. O presente estudo objetivou avaliar os aspectos epidemiológicos destes hemoparasitos em cães de ambiente urbano e rural na mesorregião do Leste Maranhense, verificando-se as possíveis diferenças da frequência entre sexo, faixa etária, raças e atividade de caça, identificando-se os possíveis fatores de risco associados à infecção por estes agentes. Carrapatos foram coletados dos animais, identificados e pesquisados quanto à presença de riquetsias pela PCR. Amostras de soro e sangue de 323 cães foram colhidas em três municípios da microrregião de Chapadinha (Anapurus, Chapadinha, Mata Roma) para a realização da RiFI para *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* spp. e PCR para *Babesia canis vogeli* e *Rickettsia* spp. O parasitismo por carrapatos foi encontrado em 59,94% dos cães, sendo de três espécies: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma cajennense*. Quanto ao tipo de infestação verificou-se associação significativa ($p < 0,05$), apenas para infestação mista sendo que, animais da zona rural apresentaram maior frequência, 12,44% de animais infestados e zona urbana foi considerado um fator de proteção para infestação (OR=0,08). Para a RiFI estimou-se uma prevalência de 16,1%, 14,6%, 18,9% para *B. canis*, *E. canis* e *Rickettsia* spp., respectivamente. O único fator associados à infecção para *B. canis* foi raça. Para *E. canis*, as variáveis analisadas não foram associadas à infecção confirmando que não há predisposição racial, sexual ou etária. Para *Rickettsia* determinou-se *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela infecção natural de 19,67% dos cães, verificando-se associação significativa ($p < 0,05$) para animais de zona rural (32,9%), onde animais da zona urbana tiveram uma chance menor de se infectar (OR= 0,06). No PCR de sangue para *B. canis vogeli* 3 amostras foram positivas e para *Rickettsia* spp. todas as amostras foram negativas. A PCR dos carrapatos revelou uma amostra positiva para *Rickettsia bellii*. Conclui-se que *B. canis*, *E. canis* e *Rickettsia* spp. infectam os cães de zona rural e urbana na localidade de estudo.

Palavras-chaves: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* spp., Maranhão.

COSTA, A. P. **Epidemiological data of *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban and rural environment from Chapadinha, east region of Maranhão - Brazil** [Aspectos epidemiológicos de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* sp. em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do leste Maranhense, microrregião de Chapadinha-MA, Brasil]. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

ABSTRACT

Infections by *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. Can lead to important diseases in small animals. Furthermore are of public health interest due to their zoonotic risk. The objective of the present study was to evaluate the epidemiological data of these hemoparasites in dogs from urban and rural environment from the east region of Maranhão, verifying the possible differences among sex, age, breed and hunting activity and associated risk factors. Ticks were collected from the dogs, identified and infection by *Rickettsia* was investigated by PCR. Serum and blood samples were collected from 323 dogs from the municipalities of Anapurus, Chapadinha and Mata Roma (Chapadinha, east region of Maranhão), to IFAT analysis for *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. Infestation by ticks was observed in 59,9% of the dogs, and ticks were identified as *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma cajennense*. There was significant association ($p < 0,05$) only for mixed infestations dogs from rural area presented higher frequency of tick infestation (12, 44%). Living urban areas was considered a protection factor for the infestation (OR=0,08). The prevalence using IFAT was 16,1%, 14,6%, 18,9% for *B. canis*, *E. canis* and *Rickettsia* spp., respectively. The only factor associated with *B. canis* infection of the dog breed, however for *E. canis*, breed, sex and age were not associated with the infection. It was determined *R. amblyommii* as the probable antigen responsible for 19,67% of natural dog infection. A significant association ($p < 0,05$) was observed for the dogs from the rural area (32, 9%). Animal from the urban area had a lower chance of infection (OR= 0,06). In PCR of the blood three samples were positive for *B. canis vogeli* e all samples were negative for *Rickettsia*. Ticks samples were negative for *Rickettsia bellii* by PCR. It was concluded that *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp infected dogs of the studied area.

Key Words: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* spp., Maranhão.

1 INTRODUÇÃO

O aparecimento de novas, e a reemergência de doenças transmitidas por artrópodes são desafios para a medicina veterinária e humana. Ambos, os artrópodes e as infecções transmitidas por eles, estão expandindo seus limites zoogeográficos devido à mudança climática e à maior acessibilidade a certos nichos ambientais (SHAW et al., 2001).

Dentre estes ectoparasitas, os carrapatos têm despertado o interesse da comunidade científica e da saúde pública devido a sua participação na transmissão de doenças como a babesiose, hepatozoonose, ehrlichiose, rickettsiose e borreliose (FÖLDVÁRI et al., 2005).

As doenças que envolvem a transmissão por carrapatos geralmente têm uma distribuição focal, uma vez que a mobilidade do vetor é limitada, exceto quando transportados por vertebrados (SERRA-FREIRE, 2010). Neste contexto, carrapatos em cães servem de marcadores de comportamento e deslocamento de cães entre áreas urbanas, rurais e naturais, fornecendo uma ponte para bioagentes patogênicos entre ambientes naturais e antrópicos (QUEIROGAS et al., 2010; ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999).

A ocorrência de carrapatos em cães no Brasil mostra dois cenários distintos intimamente dependentes do ambiente onde o hospedeiro vive. No primeiro cenário, os cães são criados em ambientes urbanos, dentro ou fora das residências, não tendo acesso às áreas onde vivem carnívoros silvestres ou outros mamíferos. Neste caso, os carrapatos encontrados nos cães são, na sua grande maioria, *Rhipicephalus sanguineus*, espécie que têm hábitos nidícolas, introduzida no Brasil, possivelmente, pelo homem. No segundo cenário, os cães são criados em áreas rurais ou suburbanas, onde vivem soltos e têm acesso livre às matas e à outros ambientes, onde várias espécies de animais silvestres e domésticos estão presentes. Nestas condições, os cães podem ser infestados por diferentes espécies de carrapatos nativos, pertencentes ao gênero *Amblyomma* (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

Registros disponíveis na literatura relatam que cães originários de áreas rurais são comumente infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma*, notadamente das espécies *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. aureolatum*, *A. oblongoguttatum* e *A. tigrinum*. Algumas destas espécies estão incriminadas como vetores de bioagentes.

No Brasil, os principais hemoparasitos de cães são *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* os quais têm como vetor o carrapato da espécie *R. sanguineus*.

A babesiose é entre o grupo de protozoários que acometem os cães, o de maior importância por ser uma enfermidade cosmopolita, causada por espécies do gênero *Babesia*, e mais freqüente em regiões tropicais e subtropicais (DANTAS-TORRES & FIGUEREDO, 2006).

Estudos realizados com isolados brasileiros de babesias de cães mostram que no Brasil, a babesiose canina é causada predominantemente pela *B. canis vogeli*, com relatos de ocorrência de *B. gibsoni* no sul do país (TRAPP et al., 2006). Esta prevalência varia consideravelmente de acordo com o método de diagnóstico utilizado, época do ano e amostra populacional utilizada.

A Ehrlichiose Monocítica Canina é uma enfermidade causada por *Ehrlichia canis*, uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória que normalmente infecta as células mononucleares sanguíneas, principalmente monócitos e linfócitos de cães, gatos e homem (DUMLER et al., 2007).

O conhecimento da distribuição geográfica e do potencial zoonótico das infecções erliquiais têm aumentado nos últimos anos, dessa forma a identificação desses parasitos que acometem os cães é importante para a elaboração de medidas de controle da enfermidade, evitando assim, a transmissão para o homem.

No Brasil, a presença de *E. canis* foi documentada pela primeira vez em 1973, em Belo Horizonte, desde então vários estudos sorológicos e moleculares foram realizados no Brasil, demonstrando a presença de espécies de *Ehrlichia* circulando entre cães com prevalência variável dependendo da população estudada e do método de diagnóstico utilizado.

Estudos realizados nas regiões Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste demonstram que a erliquiose está presente em todo território brasileiro, apresentando caráter endêmico em algumas regiões, sendo, portanto necessários mais estudos para melhor caracterização desse agente no Brasil (LABARTHE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007; SAITO et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; DAGNONE et al., 2009; UENO et al., 2009).

Rickettsias são bactérias intracelulares obrigatórias que estão classicamente divididas em dois grupos: o grupo tifo (GT), composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas com piolhos e pulgas, respectivamente. O grupo da febre maculosa (GFM), inclui mais de 20 espécies válidas, principalmente associadas à carrapatos (por exemplo, *Rickettsia Rickettsii* e *Rickettsia parkeri*) e pelo menos uma espécie associada com pulgas, *Rickettsia felis* (PAROLA et al., 2005).

Segundo Labruna (2009), na América do Sul, durante este século, pelo menos 7 espécies de *Rickettsias* foram registradas infectando carrapatos: *R. parkeri* no Uruguai e no Brasil; *R. massiliae* na Argentina; *Candidatus "Rickettsia amblyommi"* na Argentina, Brasil e Guiana Francesa; *R. bellii* na Argentina e no Brasil; *R. rhipicephali* no Brasil, *Candidatus "Rickettsia andeanae"* no Peru e *R. felis* infectando pulgas na Argentina, Brasil, Chile, Peru e Uruguai. Todas estas espécies são classificadas no GFM, exceto a *R. bellii* que não faz parte do GT e nem GFM.

No Brasil, os cães vêm sendo indicados como animais sentinelas da situação epidemiológica da febre maculosa em regiões endêmicas, por isso, diversos estudos soropidemiológicos na população canina têm sido feitos, com intuito de estimar a prevalência de rickettsioses no país (CARDOSO et al., 2006) e dessa forma, poder se determinar novas áreas de ocorrência de Febre Maculosa Brasileira (FMB).

A subnotificação da doença em cães pode ocorrer devido ao conhecimento limitado da epidemiologia, aliado à ocorrência de sinais clínicos inespecíficos e à falta de inclusão no diagnóstico diferencial com outras doenças febris agudas por médicos veterinários.

Com a degradação ambiental, as relações parasitos-hospedeiros também são modificadas, levando ao desequilíbrio. O reflorestamento feito com arbustos e a prática agrícola de criar monoculturas favorecem a proliferação de artrópodes devido à formação de microclimas favoráveis, o qual gera um excelente habitat favorecendo a sobrevivência dos ixodídeos e mamíferos hospedeiros dos estádios intermediários (CARDOSO et al., 2006). Nesse contexto, os carrapatos emergem como importantes vetores de doenças entre animais domésticos, silvestres, aves e o homem uma vez que, o processo de urbanização de áreas antes consideradas rurais aproxima o homem e os animais domésticos ao contato com animais silvestres portadores, aumentando o risco de contaminação.

No Maranhão com a expansão das atividades agrícolas houve um aumento da pressão sobre os nichos ecológicos. A monocultura da soja tem como método de expansão no estado o desmatamento ilegal e a expulsão dos antigos posseiros. Este modelo de crescimento econômico centrado no uso abusivo dos recursos naturais tem proporcionado grande impacto na flora e na fauna da região, comprometendo a biodiversidade do cerrado (PEDROSA, 2007) podendo, dessa forma, levar a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes, estabelecendo-se assim novas relações entre hospedeiros e parasitas, e novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão de enfermidades. Como consequência dessas novas relações pode ocorrer casos de zoonoses, sob a forma de epidemias por migração de animais suscetíveis e o aumento da disseminação geográfica da doença.

Infecções por *Ehrlichia*, *Babesia* e *Rickettsia* podem causar doenças importantes na clínica de pequenos animais. Além disso, são de interesse em saúde pública, devido ao potencial zoonótico. Contudo, no nordeste brasileiro, onde existe uma alta prevalência do parasitismo de cães por carrapatos transmissores, há poucos estudos com o objetivo de conhecer aspectos epidemiológicos, ou determinar fatores associados à infecção, bem como caracterização molecular destes parasitos. Por isso, o estudo da epidemiologia dessas enfermidades torna-se imprescindível para um conhecimento mais

amplo dos focos naturais das zoonoses, visando estabelecer os fatores de risco que permitam avaliar o impacto destas parasitoses. Conhecer a verdadeira magnitude dessas infecções para o estado do Maranhão irá subsidiar cientificamente, as ações dos serviços de Saúde Pública.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carrapatos

Carrapatos são artrópodes, da classe Arachnida, de distribuição mundial, parasita vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (MARTINS et al., 2009). São ectoparasitas importantes dos seres humanos e animais e, entre sua ampla gama de efeitos deletérios, transmitem patógenos para hospedeiro de forma excepcional (SZABÓ et al., 2010).

Das 850 espécies consideradas válidas no mundo, cerca de 680 fazem parte da família Ixodidae e 170 da família Argasidae, e podem ser considerados como reservatórios perpetuando o poder de transmissão dos agentes para a sua descendência, por meio transovariana e / ou transestadial. (SERRA- FREIRE, 2010). No Brasil, Dantas-Torres et al. (2009) relatam 61 espécies, sendo 44 espécies de Ixodidae e 17 espécies Argasidae. Nestas duas famílias, cerca de 10% das espécies conhecidas são vetores de agentes patogênicos, embora sejam os ixodídeos os que se revestem de maior importância médica (SILVA et al., 2006).

A diversidade de espécies de carrapatos parasitando cães no Brasil é resultante dos diferentes ecossistemas do território nacional. Nesse sentido, as características ambientais e a diversidade de espécies de hospedeiros de cada área são os pontos fundamentais para a existência de determinadas espécies de carrapatos nos cães (LABRUNA et al., 2001), de forma geral em áreas urbanas *R. sanguineus* é o principal carrapato de cães (SHAW et al., 2001). Em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma* infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas (LABRUNA et al., 2000).

Carrapatos da família Ixodidae possuem altas taxas de reprodução e podem ser transportados por longas distâncias através de seus hospedeiros. Nesse contexto, cães que entram na mata ou que compartilham seu ambiente com a fauna silvestre, podem apresentar infestações mistas, por exemplo, *A. cajennense*, *A. ovale* e *R. sanguineus* (PEREZ et al., 2008), participando de forma decisiva na disseminação e adaptação dos carrapatos a diversos tipos de ambientes. Dessa forma, os carrapatos dos cães são particularmente

importantes não só porque os cães são animais domésticos e de companhia, mas também, devido a sua distribuição cosmopolita e muitas das vezes circularem irrestritamente podendo carrear carrapatos e patógenos para ambientes preservados tornando a conservação da fauna um problema (SZABÓ et al., 2010).

Na região neotropical *R. sanguineus* é quase que exclusivo carrapato de cão embora possa, ocasionalmente, ser encontrado sobre outros mamíferos (LABRUNA et al., 2005), sendo o ectoparasito mais freqüente em cães domiciliados e errantes (DANTAS-TORRES et al., 2004).

Acredita-se que essa espécie de carrapato é originária do continente africano e que sua introdução no continente americano tenha ocorrido associada ao cão doméstico. Este é tido como o principal hospedeiro e responsável pela manutenção das populações desse carrapato no ambiente. Formas imaturas do vetor podem parasitar roedores e outros pequenos mamíferos e, na forma adulta, se alimenta em animais de grande porte, como carnívoros silvestres, ungulados e humanos (ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999; LABRUNA & PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES, 2008).

R. sanguineus também domina infestações em áreas rurais. Esta espécie de carrapato foi associada com cães restritos por cercas ou vinculados as suas casas e assim, vivem em microambiente similar aos de cães urbanos (SZABÓ et al., 2010). Na zona rural, a infestação ocorre apenas em cães confinados, enquanto que naqueles criados livre as infestações são inexistentes ou insignificantes devido à ausência da espécie no ambiente. Isso se deve ao seu hábito nidícola, vivendo entocado nas frestas dos abrigos dos cães hospedeiros (DANTAS-TORRES, 2008).

Ressalta-se que *R. sanguineus* é responsável pela transmissão de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis vogeli* dois patógenos de cães importância mundial (PELEG et al., 2010).

A ocorrência de carrapatos Neotropicais de animais silvestres em cães domésticos é relatada com relativa frequência (SZABÓ et al., 2001; LABRUNA et al., 2005; ABEL et al., 2006; SZABÓ et al., 2007). Cães de área rural, que possivelmente compartilham o ambiente com outros hospedeiros

domésticos e selvagens, são infestados principalmente por espécies de *Amblyomma* (LABRUNA & PEREIRA, 2001), particularmente, *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. cajennense* e *A. tigrinum* (EVANS et al., 2000; LABRUNA et al., 2001). De igual forma, os seres humanos, são hospedeiros acidentais destes carrapatos quando penetram no meio rural (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

As espécies do gênero *Amblyomma*, assumem grande importância na transmissão de patógenos, por utilizarem mais de um hospedeiro e possuírem ampla distribuição geográfica no continente Americano. Trata-se de carrapatos de parasitismo eclético, cujas larvas podem ser encontradas sobre qualquer mamífero doméstico, silvestre, aves e no homem (MASSARD & FONSECA, 2004). Estes carrapatos surgiram no período cretáceo quando houve uma redução substancial dos hospedeiros répteis. Hoje apenas um terço dos carrapatos deste gênero parasitam répteis refletindo a história evolutiva inicial (CUPP, 1991).

Segundo Pinter et al. (2004) infestações por carrapatos do gênero *Amblyomma*, em cães no Brasil, são caracterizadas por baixa infestação. Provavelmente, isto ocorre pelo cão não ser o hospedeiro ideal. Entretanto, se o cão está em local permissivo para o desenvolvimento destas espécies, ou se este se encontra em contato com outros animais, hospedeiros preferenciais, a infestação acontece (SZABÓ et al., 2001).

Entre os carrapatos do gênero *Amblyomma* descritos no Brasil o *A. cajennense* é o mais freqüentemente associado ao parasitismo em humanos, sendo considerado o principal vetor de doenças no país, especialmente os estágios imaturos e também considerado o principal vetor do agente da febre maculosa (PEREIRA & LABRUNA, 1998; ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999; FREITAS et al., 2010). Rozental et al. (2002) afirmam que a febre maculosa é a doença mais importante transmitida por estes carrapatos.

Lemos et al. (1997) descreveram a presença de *A. cajennense* em diferentes hospedeiros incluindo homens, demonstrando a facilidade que este carrapato tem de se adaptar a diferentes hospedeiros, reafirmando a importância deste na transmissão de zoonoses a humanos no Brasil.

No Brasil foram relatadas na região Amazônica, outras espécies assumindo importância no parasitismo humano *A. oblongoguttatum*, *A. sculpturatum* e *A. ovale* (LABRUNA et al., 2002).

A. ovale relatado em várias espécies de carnívoros silvestres, também pode infestar cães de áreas rurais do Brasil (ARAGÃO & FONSECA, 1961; LABRUNA et al., 2001).

O estudo da ixodofauna em áreas rurais, tendo em vista as doenças que eventualmente possam ser transmitidas pelos carrapatos, é um assunto pouco explorado em muitas regiões do Brasil e que deve ser aprofundado e difundido na classe médico-veterinária, tendo em vista sua grande importância para a epidemiologia de carrapatos e doenças transmitidas por estes (MARTINS et al., 2009). Neste sentido o levantamento da fauna acarológica é uma ferramenta importante no reconhecimento e determinação das áreas de ocorrência dos carrapatos, principalmente onde exista interação entre vida selvagem e animais domésticos. Este é o primeiro passo para estimar o risco do surgimento de surtos de doenças, suas interações entre animais domésticos, selvagens e humanos e conseqüentemente formular programas de manejo adequados da vida selvagem (WILLIAMS et al., 2002).

2.2 *Babesia canis*

Protozoários do gênero *Babesia* são parasitos intraeritrocíticos transmitidos por carrapatos. Membros deste gênero infectam naturalmente uma ampla gama de mamíferos, incluindo roedores, canídeos, bovídeos, silvestres e o homem (CARRET et al., 1999; KJEMTRUP & CONRAD, 2000; DANTAS-TORRES & FIGUEREDO, 2006).

A babesiose foi descoberta em 1888, quando Victor Babés descreveu a presença de microorganismos intraeritrocitários responsáveis pela morte de 50 mil cabeças de gado na Romênia e classificou-os como bactérias. Em 1893, Kilborne e Smith descreveram um agente que provocava febre no gado do Texas, dando-lhes a classificação de gênero e nome *Babesia* (KJEMTRUP & CONRAD, 2000). No entanto, a primeira descrição da

babesiose canina causada por *Babesia canis* deve-se, em 1895, a Piana e Galli-Valerio, na Itália (O'DWYER et al., 1997).

Babesia spp. está classificada taxonomicamente na ordem Piroplasmida, filo Apicomplexa (IRWIN, 2009). Em cães a babesiose é causada por grandes piroplasmas como a *Babesia canis* e por pequenos parasitas agrupados sob a denominação de *Babesia gibsoni*. Esses dois agentes causam doenças tanto em cães domésticos quanto em canídeos silvestres (BOOZER & MACINTIRE, 2003; IRWIN, 2010).

Dentre as babesias isoladas em cães infectados em diferentes países, algumas heterogeneidades foram observadas, o que levou a reclassificação da espécie *B. canis* em três subespécies (*Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli*), com base na ausência de imunidade cruzada, teste sorológico, especificidade do vetor e filogenia molecular, sendo consideradas espécies separadas (ZHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999).

A *B. canis vogeli* é encontrada no Oriente Médio, Norte da África, Europa, Ásia, Austrália e América do Sul sendo transmitida pelo *R. sanguineus*, induzindo normalmente uma doença considerada de baixa patogenicidade com sinais clínicos moderados, já *B. canis canis*, descrita na Europa, é transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* considerada de patogenicidade moderada e *B. canis rossi*, descrita na África do Sul, transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi* causando uma doença hemolítica severa e freqüentemente fatal (UILENBERG et al., 1989; ZHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999; BOOZER & MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005). No Brasil, confirmou-se molecularmente que *B. canis vogeli* é a principal babesia de cães com relatos isolados de ocorrência de *B. gibsoni* no sul do país (PASSOS et al., 2005; SÁ et al., 2006; TRAPP et al., 2006).

A transmissão de *Babesia* spp. ocorre por meio da picada de carrapatos ixodídeos, sendo estes os vetores biológicos. No Brasil, o principal vetor de *B. canis vogeli* é *R. sanguineus* (PASSOS et al., 2005). Nestes carrapatos ocorre transmissão transovariana, pois a teleógina infectada transmite o parasito para os estádios subsequentes e transmissão estadial,

quando larvas eclodem já infectadas, ao mudarem para ninfas e depois adultos, permanecem infectadas, transmitindo o protozoário em todos os estágios, sendo as ninfas e adultos mais eficientes na transmissão (TABOADA, 1991).

Animais jovens são mais susceptíveis à infecção que os animais adultos. Em cães com idade entre 3 e 6 meses a frequência de anticorpos é menor e constituem o grupo de maior risco de adquirir a infecção por *B. canis* (RIBEIRO et al., 1990). Cães com idade inferior a 3 meses são protegidos por anticorpos de origem materna (FARWELL et al., 1982).

No Brasil, as frequências de *Babesia* spp. em cães registradas revelam diferenças em relação a amostra populacional, região do país selecionada, da procedência urbana ou rural e à técnica de diagnóstico utilizada.

O diagnóstico da babesiose canina geralmente se baseia na identificação dos parasitas no interior dos eritrócitos ou livres no plasma, através da técnica do esfregaço sanguíneo (UNGAR DE SÁ et al., 2007). Entretanto, essa técnica é limitada pela baixa sensibilidade e impossibilidade para distinguir morfologicamente cepas similares e espécies (KRAUSE et al., 1996).

Outros métodos, mais sensíveis estão sendo cada vez mais utilizados no diagnóstico desta enfermidade, como a prova da imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (BOOZER & MACINTIRE, 2003). Esses testes sorológicos são úteis para identificar animais assintomáticos e diagnosticar infecções crônicas quando o nível de parasitemia geralmente está baixo ou não detectável no esfregaço de sangue periférico (DELL'PORTO et al., 1993; YAMANE et al., 1993; FURUTA, et al., 2009).

Casos de babesioses caninas usando estes testes tem sido reportados em alguns estados do Brasil, tais como no Paraná (TRAPP et al., 2006), Rio de Janeiro (MIRANDA et al., 2008), Minas Gerais (MAIA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009), São Paulo (FURUTA et al., 2009) e Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2004).

Embora a RIFI e o ELISA sejam considerados testes com alta sensibilidade possuem moderada especificidade para detecção de anticorpos contra *Babesia* sp. em cães (DELL'PORTO et al., 1993; YAMANE et al., 1993; FURUTA et al., 2009) além de apresentarem limitações, sendo a principal delas é que apenas indicam a exposição ao agente, não informando sobre o estágio atual da infecção (WAGNER et al., 1992), assim, o uso de testes moleculares, especialmente à reação em cadeia pela polimerase (PCR), vêm sendo cada vez mais utilizado como complemento dessas duas técnicas para estudos epidemiológicos.

A PCR é uma ferramenta que identifica fragmentos de DNA do parasita. A grande vantagem dos métodos moleculares em relação às outras técnicas é a maior sensibilidade na detecção de protozoários do gênero *Babesia* no sangue periférico (BASHIRUDDIN et al., 1999). Passos et al. (2005) relataram pela primeira vez *B. canis vogeli* no Brasil em cães naturalmente infectados através da PCR. Este estudo, através da amplificação do fragmento 18S rDNA, mostrou 100% de homologia entre a amostra brasileira e isolados encontrados na Espanha, França, Japão, Austrália e África do Sul.

Outros estudos utilizando técnicas moleculares vêm sendo conduzidos em outras regiões do país. Em áreas rurais no estado de São Paulo, Lopes et al. (2006) seqüenciando o fragmento 18S do rDNA de duas amostras de cães encontraram identidade com *B. canis vogeli* já caracterizada no Brasil e mais recentemente, ainda em áreas rurais de São Paulo a presença de infecção por *Babesia* spp. em cães tanto por técnicas parasitológicas de esfregaços sanguíneos quanto moleculares (PCR) foi investigada, constatando que pela análise de esfregaços sanguíneos, apenas 2% dos cães estavam infectados, enquanto pela PCR, 18% dos animais foram positivos, demonstrando a sensibilidade da técnica. Neste trabalho, o seqüenciamento de quatro amostras positivas demonstrou alta identidade com *B. canis vogeli* (O'DWYER et al.; 2009).

Costa-Júnior et al. (2009) relatam que a incidência de *B. canis vogeli* em Minas Gerais nas cidades de Nanuque, Belo Horizonte e Lavras foi de

24,1%, 4,2% e 1,5% respectivamente, por meio da PCR em tempo real. Na região nordeste, Ramos et al.(2010) identificaram a presença de *Babesia canis vogeli* em cães da região metropolitana de Recife.

Yamane et al. (1994) enfatizaram que o conhecimento da frequência e distribuição de cães potencialmente portadores de *B. canis* tem valor epidemiológico significativo. Em locais onde o número de cães suscetíveis é alto e carrapatos ixodídeos são amplamente distribuídos, a doença pode ser facilmente disseminada. Dessa forma, inquéritos soroepidemiológicos são fundamentais na avaliação da situação atual da doença e na determinação dos fatores de risco para a população animal e quando aliados às técnicas moleculares tem implicações importantes em muitas áreas da parasitologia, possibilitando maior esclarecimento, identificação precisa do parasito e novas abordagens no controle do parasitismo. Estes estudos têm fornecido informações a respeito de taxonomia e filogenia auxiliando nos estudos de ecologia, genética de populações e epidemiologia (GASSER, 2006). Com base nessas informações, medidas eficazes de controle pode ser planejadas e implementadas (MAIA et al.; 2007).

2.3 Ehrlichia canis

A *Ehrlichia canis* é o agente da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), uma enfermidade que acomete cães, com distribuição mundial especialmente em áreas tropicais e subtropicais (NAKAGHI et al., 2010; PELEG et al.,2010).

Descrita pela primeira vez na Algéria em 1935 por Donatien & Lestoquard (VIEIRA et al., 2011), teve importância significativa no final de 1968 e início de 1969, durante a guerra do Vietnã, quando cães militares da Inglaterra e dos Estados Unidos foram acometidos de uma hemorragia severa de princípio inesperado e de etiologia desconhecida. A doença recebeu vários nomes, como febre hemorrágica canina, síndrome hemorrágica idiopática, doença do cão rastejador e pancitopenia tropical canina (HUXSOLL, 1976).

Considerada atualmente a mais importante doença transmitida por carrapatos aos cães da América Latina, apresenta ocorrência significativa em

vários países, inclusive no Brasil (PEREZ et al., 1996; UNVER et al., 2001; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005; AGUIAR et al., 2007; CARLOS et al., 2007; SAITO et al., 2008; SILVA et al., 2010). A erliquiose tem sido motivo de grande interesse tanto para pesquisas em medicina veterinária quanto para saúde pública (STICH et al., 2008).

Segundo Dumler et al. (2001) o gênero *Ehrlichia* pertence a ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, subdivisão α das Proteobactérias, fazendo parte deste gênero as espécies *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminatum* e *E. canis*. São bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, que se replicam dentro de vacúolos de células eucarióticas dos hospedeiros, particularmente em células hematopoiéticas maduras ou imaturas (RIKIHISA, 1991).

No Brasil existem duas espécies descritas em cães a *E. canis* e *E. ewingii* (COSTA et al., 1973; OLIVEIRA et al., 2009) com evidências sorológicas da presença de *E. chaffeensis* em cães no Estado de Minas Gerais (GALVÃO et al., 2002) e detecção de DNA desta espécie em cervídeo (*Blastocerus dichotomus*) capturado no Rio Paraná entre o sudoeste do Estado de São Paulo e leste de Mato Grosso do Sul (MACHADO et al., 2006).

No país, a infecção por *E. canis* é considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas e está veiculada ao seu vetor, o carrapato *R. sanguineus*, de distribuição cosmopolita e que se encontra disseminado por toda área urbana do Brasil (LABRUNA & PEREIRA, 2001; AGUIRRE et al., 2004). A presença desse vetor no animal caracteriza importante fator de risco para ocorrência da doença (TRAPP et al., 2006; DAGNONE et al., 2003).

O carrapato se infecta ao ingerir sangue com leucócitos parasitados por *E. canis*, geralmente na segunda ou terceira semana de infecção no cão (RIKIHISA et al., 1991). Ocorre transmissão transestadial, mas não transovariana, sendo capazes de transmitir a bactéria principalmente nas fases de ninfa e adulto num período de 155 dias (ANDEREG & PASSOS, 1999; DAGNONE et al., 2001; AGUIAR et al., 2007; DANTAS-TORRES, 2008). Durante o repasto sanguíneo em outro cão, os carrapatos inoculam a secreção salivar contaminada no interior do sítio de alimentação no hospedeiro,

estimulando uma resposta inflamatória local e o fluxo de células mononucleares favorecendo assim, a disseminação da bactéria no novo hospedeiro (RIKIHISA, 1991; DAGNONE et al., 2001).

Segundo Aguirre et al.(2008) a ocorrência de EMC vem aumentando significativamente nos últimos anos em todas as regiões do Brasil, onde foi relatada pela primeira vez por Costa et al. (1973), em Belo Horizonte. Posteriormente surgiram relatos da doença em todas as regiões do país, com prevalências que variam de 4,8% a 86,2% (LABARTHE et al., 2003; MACIEIRA et al., 2005; TRAPP et al., 2006; AGUIAR et al., 2007; CARLOS et al., 2007; COSTA-JÚNIOR et al., 2007; DINIZ et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; NAKAGHI et al., 2008; ORIÁ et al., 2008; SAITO et al., 2008; DAGNONE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Fatores epidemiológicos relacionados às condições climáticas, distribuição do vetor, população sob estudo, comportamento animal e habitat, assim como a metodologia empregada na investigação do agente, podem afetar os níveis de prevalência da erliquiose canina no Brasil (DAGNONE et al., 2001).

O método utilizado para a pesquisa do agente pode explicar, em parte, as diferenças nas taxas de prevalência da doença. Detecção direta de mórulas intracitoplasmática de *E. canis* em esfregaço sanguíneo é um método de diagnóstico rápido e de baixo custo, entretanto, a sensibilidade do método é baixa, já que o microrganismo está presente em pequeno número na corrente sanguínea durante a infecção e a proporção de células infectadas pode ser menor do que 1% (DAGNONE et al., 2001; PADDOCK & CHILDS, 2003; NAKAGHI et al., 2010).

O isolamento é um dos melhores métodos para diagnóstico, pois é sensível e específico, porém, este método é demorado e requer um nível de experiência técnica que geralmente não é encontrado na maioria dos laboratórios, dificultando o seu uso como diagnóstico de rotina (AGUIRRE et al., 2004).

Dentre os testes sorológicos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o mais amplamente utilizado no diagnóstico da erliquiose,

sendo aplicável tanto para estudos de infecções experimentais quanto epidemiológicos (SILVA et al., 2010). Isto porque as bactérias do gênero *Ehrlichia* induzem resposta humoral específica, sendo a base para o diagnóstico sorológico (RIKIHISA, 1991), ocorrendo soroconversão nos animais logo após a infecção (OTRANTO et al., 2009). A principal desvantagem deste método é a possibilidade de existir reações cruzadas entre organismos relacionados, levando a falsos diagnósticos, além disso, a presença de anticorpos não indica uma infecção ativa, tornando necessária a confirmação do diagnóstico por outras técnicas (PAROLA & RAOULT, 2001).

O advento das técnicas moleculares para a detecção de *E. canis*, principalmente a PCR tem permitido um diagnóstico rápido, além de uma elevada sensibilidade e especificidade para a erliquiose, nas fases aguda e crônica da doença (IQBAL & RIKIHISA, 1994). A principal vantagem do método é ser espécie-específico para as diferentes espécies de *Ehrlichia* o que nem sempre é possível com outras técnicas (MATHEWS et al., 2000)

A nested-PCR tem sido utilizada em muitos estudos por apresentar alta sensibilidade e especificidade pois é capaz de detectar 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis*, enquanto que uma só amplificação de DNA permite detectar apenas valores acima de 20 pg (WEN et al., 1997). Sensibilidade, especificidade, facilidade de uso, rapidez, e a capacidade de analisar um grande número de amostras ao mesmo tempo faz da nested PCR uma opção superior para a detecção de início, bem como erliquiose canina persistente (LAKSHMANAN et al., 2007). A PCR em combinação com a RIFI possibilita um diagnóstico rápido e preciso da erliquiose (IQBAL et al., 1994).

A intensa atividade agropecuária no Brasil, o convívio do homem com animais domésticos e a valorização de atividades ao ar livre favorecem a disseminação de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, propiciando a emergência e reemergência de diferentes agentes etiológicos (MASSARD & FONSECA, 2004). Nesse contexto, membros da família *Anaplasmataceae* emergem como importantes patógenos que infectam animais e seres humanos, (INOKUMA et al., 2001), estes são hospedeiros acidentais destes patógenos e os casos recentes de erliquiose em humanos têm sido associados com

mudanças ecológicas, demográficas e na susceptibilidade dos hospedeiros (PADDOCK & CHILDS, 2003).

No Brasil já há relatos da ocorrência dos primeiros casos de erliquiose humana (CALIC et al., 2004; COSTA et al., 2006) e na Venezuela há relatos da presença de *E. canis* em pacientes assintomáticos e sintomáticos (PEREZ et al., 1996.). A presença de espécies de *Ehrlichia* circulando entre cães e seus ectoparasitos, denota a possibilidade de acometimento humano, tornando-se importante estudos para o melhor conhecimento da história natural da doença a fim de elaborar medidas de controle.

2.4 *Rickettsia* spp.

O gênero *Rickettsia* compreende pequenas bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, subdivisão α da classe Proteobacteria, associada com células eucarióticas, pertencente à ordem Rickettsiales e à família Rickettsiaceae (RAOULT & ROUX, 1997; RENVOISÉ et al., 2009). Estão entre as mais importantes doenças zoonóticas emergentes e reemergentes das Américas sendo transmitidas por vetores artrópodes que incluem pulgas, piolhos, carrapatos e ácaros (PACHECO et al., 2008; BERMUDÉZ et al., 2009).

Este gênero é classicamente dividido em dois grupos bem definidos, baseados nos padrões antigênicos, moleculares e ecológicos: o Grupo do Tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* (agente do tifo epidêmico) e *Rickettsia typhi* (tifo endêmico ou murino), transmitidas por piolhos e pulgas, respectivamente e o Grupo da Febre Maculosa (GFM), o qual está composto por mais de 20 espécies válidas, mais associadas com carrapatos e uma espécie associada com pulgas (HORTA et al., 2007; PACHECO et al., 2008).

Nas Américas, o grupo da febre maculosa é bem caracterizado como agente da febre das Montanhas Rochosas (Estados Unidos), “fiebres manchadas” (México) e da febre maculosa brasileira (GURGEL, 2009), e entre as diferentes espécies deste grupo, a *Rickettsia rickettsii* é considerada a mais patogênica (WALKER et al., 2008), sendo considerada uma zoonose

reemergente no Brasil e de grande impacto para a saúde pública, devido à dificuldade de diagnóstico e à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (GRECA et al., 2008).

Além da *R. rickettsii*, atualmente, existe uma gama de agentes infecciosos pertencentes ao gênero *Rickettsia* capazes de causar uma série de enfermidades. Galvão et al. (2003) afirma que algumas têm quadros clínicos mais severos, com risco de morte eminente, outras possuem sinais brandos e sem letalidade, em geral com manifestações clínicas muito semelhantes e superpostas, dificultando com isto o diagnóstico etiológico. Dentre estas, as descritas no Brasil são: *Rickettsia felis*, *Rickettsia parkeri*, *Candidatus "Rickettsia amblyommi"*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia rhipicephali* (LABRUNA, 2009).

No Brasil, um estudo realizado por Silveira et al. (2007) identificaram pela primeira vez a bactéria *R. parkeri* em área rural do município de Paulicéia – SP, em três *A. triste*, sendo um deles isolada a bactéria.

Estudos moleculares recentes reportaram uma cepa de *Rickettsia* sp. (nomeada cepa R 300) em um único carrapato *Haemaphysalis juxtakochi* coletado na floresta Amazônica do estado de Rondônia, Norte do Brasil (LABRUNA et al., 2005). As análises filogenéticas inferidos pelos genes rickettsial *gltA* (citrate synthase), *htrA* (17-kDa protein), *ompA* (190-kDa protein), e *ompB* (135-kDa protein) indicaram que a cepa R 300 era próxima a *R. rhipicephali* da América do Norte, sugerindo que era uma cepa da América do Sul de *R. rhipicephali* (LABRUNA et al., 2005). Amostra coletada de *H. juxtakochi* no estado de São Paulo (sudeste do Brasil) foi isolada a *R. rhipicephali* em culturas de células (LABRUNA et al., 2007).

R. amblyommii foi isolada pela primeira vez em 1974 do carrapato *A. americanum* nos EUA e no Brasil foi isolada em carrapatos das espécies *A. longirostre*, *A. cajennense* e *A. coelebs* na floresta amazônica. Segundo Parola et al. (2005) esta bactéria pode ser relativamente freqüente em algumas áreas americanas, pois aproximadamente 40% dos carrapatos *A. americanum* podem estar infectados e, todos os três estágios deste carrapato parasitam humanos. Recentemente, esta bactéria foi incriminada como agente causador da doença

febril em seres humanos nos Estados Unidos (APPERSON et al., 2008) e no Brasil há evidências sorológicas de infecção por esta bactéria em cães de zona urbana e rural na região amazônica (LABRUNA et al., 2007).

R. bellii, é a *Rickettsia* mais comumente encontrada em carrapatos no Brasil, tendo sido detectada e/ou isolada em *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. humerale*, *A. sculpturatum*, *A. rotundatum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. incisum*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2004; ESTRADA et al., 2006; HORTA et al., 2006; PINTER & LABRUNA, 2006.; PACHECO et al., 2008). Muito embora seja altamente prevalente nas populações de carrapatos, com frequências de infecção variando de 5 a 100%, não há evidências de infecção humana e por isso tem sido considerada não patogênica (ESTRADA et al., 2006; LABRUNA et al., 2007), porém já foi constatada evidência sorológica de infecção por esta bactéria em capivaras (PACHECO et al., 2007).

A febre maculosa brasileira tem o carrapato *A. cajennense* como principal vetor de *R. rickettsii* no Brasil (GUEDES et al., 2005). Este carrapato possui baixa especificidade parasitária, principalmente nos estágios de larva e ninfa, parasitando indistintamente diferentes classes animais incluindo humanos (PEREZ et al., 2008), porém, um dos hospedeiros primários desta espécie (equinos, antas e capivaras) deve estar presente em uma área para que uma população de carrapatos se estabeleça, pois estas espécies são essenciais para a multiplicação da fase adulta do *A. cajennense*, que se reproduz com sucesso em poucos mamíferos (SOUZA et al., 2006).

Estão ainda associadas à transmissão da febre maculosa as espécies *A. aureolatum* e *A. dubitatum* (LEMOS et al., 2002). O carrapato, *R. sanguineus*, representa um potencial agente disseminador da riquetsia, visto sua abundância na natureza e relatos de espécimes infectados naturalmente em áreas endêmicas da Febre Maculosa (DEMMA et al., 2005; WIKSWO et al., 2007, CUNHA et al., 2009).

Carrapatos da família Ixodidae possuem altas taxas de reprodução e podem ser transportados por longas distâncias através de seus hospedeiros (PEREZ et al., 2008). Essa capacidade de dispersão e adaptação dos

artrópodes facilita a manutenção e amplificação de agentes Rickettsiais na natureza.

Horta et al. (2006) observaram que *R. bellii* isolada de *I. loricatus* se manteve na população de carrapatos através das transmissões transtadial e transovariana, sugerindo este como um importante mecanismo de manutenção do agente na natureza, dessa forma, além de vetores, os carrapatos também são responsáveis pela manutenção do agente no ambiente, funcionando como verdadeiros reservatórios de riquetsias (PEREIRA & LABRUNA, 1998).

Para *R. bellii* e *R. amblyommii*, a transmissão transovariana é provavelmente, a principal via de manutenção dessas riquetsias na natureza (PAROLA et al., 2005; STROMDAHL et al., 2008).

Embora a bactéria *R. rickettsii* também seja transmitida hereditariamente entre sucessivas gerações de uma população de carrapatos, apenas este mecanismo não seria suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo, uma vez que há evidências laboratoriais de que seja patogênica para o carrapato vetor (BURGDORFER, 1988). Dessa forma para garantir que novos carrapatos se infectem, faz-se necessário a presença do hospedeiro amplificador, que mantém a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, garantindo a infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (BURGDORFER, 1988).

Segundo Labruna (2009), para que uma espécie de vertebrado seja considerada um bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza ela: (1) deve ser abundante na área endêmica para a febre maculosa; (2) deve ser um bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais; (3) deve ser suscetível à infecção por *R. rickettsii*; (4) deve manter *R. rickettsii* circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos e (5) deve ter uma alta taxa de renovação populacional.

No Brasil, pelo menos duas espécies são incriminadas como hospedeiros amplificadores eficientes para *A. cajennense*: capivaras e gambás (*Didelphis* spp.) (LABRUNA, 2009).

A importância do cão doméstico como hospedeiro amplificador para *R. rickettsii* permanece controversa na literatura (SILVA et al., 2010),

entretanto, Demma et al. (2005) afirmam que os cães são animais próximos dos humanos e podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da febre maculosa.

R. rickettsii pode causar grave doença em cães. A doença clínica foi recentemente descrita por Labruna et al. (2009) a partir da confirmação dessa enfermidade em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo. Ao se investigar os cães domésticos como possíveis animais envolvidos na epidemiologia da febre maculosa brasileira observa-se que eles, além de fornecer uma ponte para bioagentes patogênicos entre ambientes naturais e antrópicos (QUEIROGAS et al., 2010), podem atuar como sentinela para estudos epidemiológicos uma vez que cães com sorologia positiva têm sido freqüentemente registrados em regiões endêmicas, (PADDOCK et al., 2003; SANGIONI et al., 2005; PINTER et al., 2008) e sua soroprevalência para *R. rickettsii* em determinadas áreas geográficas se aproxima da encontrada em seres humanos (BREITSCHWERDT et al., 1987) .

Cães que entram na mata ou que compartilham seu ambiente com a fauna silvestre, são infestados principalmente por espécies de *Amblyomma* (SZABÓ et al., 2001; LABRUNA & PEREIRA, 2001) e devido à sua capacidade de percorrer grandes distâncias, o cão pode transportar carrapatos que, quando infectados, podem ser distribuídos para locais indenes. Deste modo, a pesquisa sorológica em cães pode refletir de maneira adequada a circulação de *Rickettsia* sp. em determinado local e indicar primariamente a presença da doença. Dessa forma a sorologia em cães pode ser um meio viável de determinar a exposição de seres humanos a *Rickettsia* sp. e predizer alterações na incidência de infecções em pessoas (RAOULT & PAROLA, 2007).

Quanto a *R. sanguineus*, representa um potencial agente disseminador da riquetsia, visto sua abundância na natureza e relatos de espécimes infectados naturalmente em áreas endêmicas para febre maculosa (WIKSWO et al., 2007), inclusive no Brasil onde recentemente foi feita a primeira identificação natural de *R. rickettsii* infectando *R. sanguineus* (CUNHA et al., 2009) , além de evidências de sua participação na epidemiologia dessa

enfermidade em uma área endêmica da região metropolitana de São Paulo, sugerindo seu papel como transmissor da bactéria a seres humanos (MORAES-FILHO et al., 2009).

Estudos de prevalência de anticorpos para *Rickettsias* do GFM em cães nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, registraram resultados discrepantes, variando entre 8% e 69,6% (LEMOS et al., 1994; LEMOS et al., 1996; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008; PACHECO et al., 2008; PEREZ et al., 2008; OTOMURA et al., 2010).

Dentre os métodos diagnósticos, os testes sorológicos são os mais frequentemente utilizados e amplamente disponíveis em todo o mundo, sendo a RIFI considerada o método sorológico de referência, utilizada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), por apresentar sensibilidade de 84,6% a 100% e especificidade de 99,8 a 100% (BROUQUI et al., 2004). Quando um título obtido para determinada espécie de *Rickettsia* for pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies testadas, pode-se sugerir que os anticorpos são homólogos à primeira espécie (LABRUNA et al., 2007).

No entanto, a RIFI não permite a identificação da espécie de *Rickettsia* envolvida na infecção, uma vez que todas as rickettsias do GFM apresentam reação sorológica cruzada entre si (PHILIP et al., 1978).

A introdução de técnicas da biologia molecular na investigação de doenças riquetsiais tem assumido grande importância na detecção de várias espécies do gênero *Rickettsia* em vetores, humanos e animais, permitindo a caracterização de espécies já conhecidas como a *R. rickettsii* e outras recentemente reconhecidas (CARDOSO et al., 2006). Entre as técnicas de biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método rápido e eficiente e tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos ou de surtos de riquetsioses para detecção de *Rickettsia* sp. em carrapatos (LABRUNA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007; PACHECO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2009).

No Brasil, a maioria dos casos de febre maculosa se concentra na Região Sudeste (DEL FIOLE et al., 2010). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) casos notificados de febre maculosa no Brasil de 1997 a 2009 ocorreram nos seguintes estados: Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Paraná, Distrito Federal, Amapá, Rio Grande do Sul, Rondônia, Tocantins, Mato Grosso e Bahia.

No entanto, sabe-se que o risco de contato com o patógeno é mais elevado em cães do que em seres humanos, tendo em vista a maior exposição dos animais a carrapatos vetores competentes (SCORPIO et al., 2008) e que a associação de casos humanos e caninos tem sido descrita em diversas áreas endêmicas de febre maculosa (SANGIONI et al., 2005), dessa forma o estudo em cães se torna necessário para se observar a frequência da FMB em diversas regiões do Brasil para se estabelecer os fatores de riscos e a implantação de medidas profiláticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Conhecer os aspectos epidemiológicos dos hemoparasitos *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* sp. em cães de ambiente urbano e rural na mesorregião do Leste Maranhense.

3.2 Específicos

- Identificar e determinar a prevalência de carrapatos;
- Estimar a frequência de anticorpos anti-*B. canis*, anti-*E. canis* e anti-*Rickettsia* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Determinar a taxa de co-infecção entre a *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp. e *Rickettsia* spp;
- Determinar os fatores associados para infecções causadas por estes hemoparasitos;
- Detectar o DNA de *Babesia* sp. e *Rickettsia* spp por meio da PCR convencional em amostras de sangue;
- Detectar *Rickettsia* spp em carrapatos por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área

A microrregião de Chapadina está localizada na mesorregião do Leste Maranhense. Está dividida em nove municípios (Anapurus, Brejo, Belágua, Buriti, Mata Roma, Milagres do Maranhão, São Benedito do Rio Preto, Chapadina e Urbano Santos). O trabalho foi desenvolvido nos municípios de Chapadina, Mata-Roma e Anapurus.(Figura 1).

Segundo dados censitários do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, ano 2010, os municípios de Chapadina, Anapurus e Mata Roma possuem uma população de 102.327 habitantes, distribuída nos 4.490 km² de área. Desse total de habitantes, 35.235 habitantes residem na zona urbana e 67.092 na zona rural.

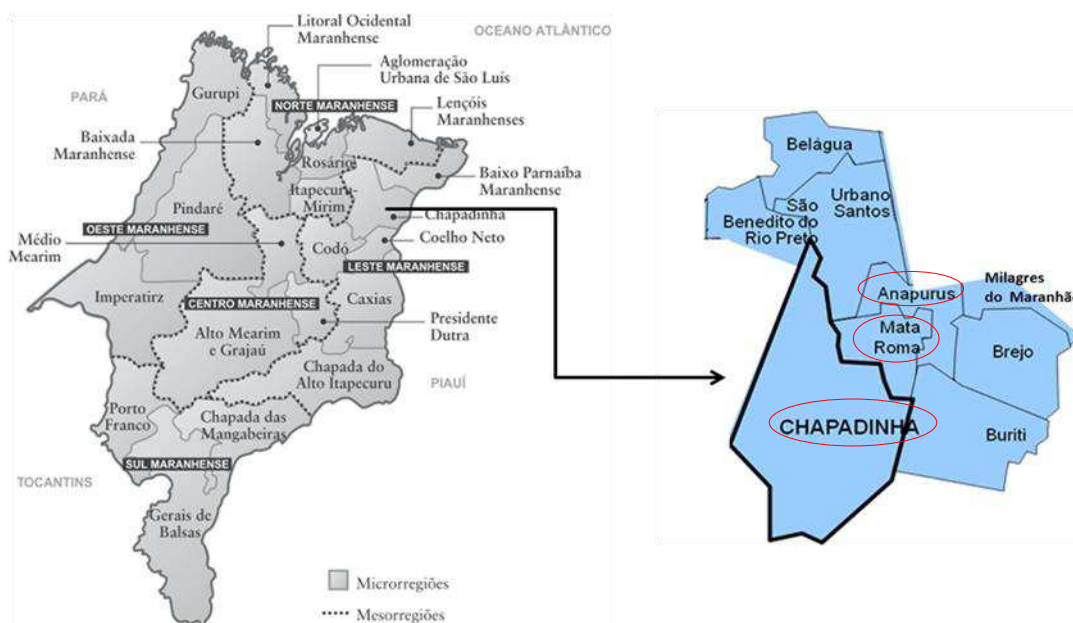


FIGURA 1 - Mapa de localização dos municípios Chapadina, Anapurus e Mata Roma – MA. (webcarta.net)

4.2 Coleta e identificação dos carrapatos

Os cães foram inspecionados para verificar a infestação por carrapatos anteriormente à coleta de sangue. Os espécimes de carrapatos foram coletados manualmente e acondicionados em frascos individuais,

contendo álcool a 70% por hospedeiro amostrado. A identificação foi realizada segundo a chave taxonômica de Aragão & Fonseca. (1961) e Onofrio et al. (2006).

4.3 Amostragem e coleta de sangue

Foram amostrados 322 cães, divididos equitativamente em área urbana e rural. Sendo 123 para o município Chapadinha, 100 para Anapurus e 99 para Mata Roma. De cada cão foi coletado 5 mL de sangue, em tubos contendo anticoagulante (EDTA) e em tubos sem anticoagulantes, por meio de punção da veia cefálica ou jugular. Da amostra com EDTA, uma alíquota de 1 mL de sangue foi acondicionada á temperatura de - 20°C para posterior extração de DNA.

4.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

4.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia canis*

A RIFI foi realizada segundo técnica descrita por IICA (1987). As lâminas de antígenos foram retiradas do freezer imediatamente antes do uso, secadas a 37°C por cinco minutos, marcadas com círculos (feitos com esmalte), onde foram colocados os soros testes, o controle positivo, controle negativo e controle PBS. Cada amostra foi testada nas diluições de 1: 40,1: 160, 1:640 e 1: 2560.

4.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Erhlichia canis*

A RIFI foi realizada a partir das células DH82 infectadas com o isolado Jaboticabal de *E. canis*, fixado em lâminas de imunofluorescência, como descrito por Ristic et al. (1972). Os soros reativos na diluição 1:80 foram testados em diluições seriadas (64, 128, 256, 512, 1024, 2048...) para

determinação do título final de reatividade (HARRUS et al., 1997; MCBRIDE et al., 2001).

4.4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Rickettsia* spp.

Os soros foram testados pela RIFI frente aos antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*. A RIFI foi realizada segundo Horta et al. (2004).

Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de *Rickettsia* foram testados em diluições seriadas (64, 128, 256, 512, 1024, 2048...) para determinação do título final de reatividade. O soro que demonstrou para uma determinada espécie de *Rickettsia* um título quatro vezes maior que para as demais espécies testadas, foi considerado homólogo para a primeira espécie do agente, conforme padrões previamente definidos (HORTA et al., 2004).

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA DO SANGUE

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras de sangue total provenientes de cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha.

Foi utilizado o procedimento de extração 300 µl de sangue total, colhido com anticoagulante EDTA, e o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Alíquotas do DNA extraído foram utilizadas nos ensaios de PCR convencional.

4.6 PADRONIZAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL

4.6.1 Oligonucleotídeos Iniciadores para *Babesia canis vogeli* e *Rickettsia* spp.

Para *Babesia canis vogeli* foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos para a realização da PCR. As seqüências basearam-se na literatura (ZÄHLER et al., 1998) e amplificam uma região de aproximadamente 590 pb do gene 18S rRNA. Como primer forward um primer selecionada de uma região conservada do gene 18S rRNA(BAB1 5'-GTG AAC CTT ATC ACT TAA AGG-3') (AF394533) e como primer reverse um gene subespécie-específico para *Babesia canis vogeli* (BAB4 5'-CAA CTC CTC CAC GCA ATC G-3) (AF394534).

Para *Rickettsia* spp. fez-se a amplificação de um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de riquetsia utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores ("primers"), denominados e CS-62 (GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT) e CS-462 (CTT CCT TAA AAT TCA ATA AAT CAG GAT G) (LABRUNA et al., 2004).

Os oligonucleotídeos (Invitrogen) foram adquiridos e diluídos a 100 pmol/ μ l com água Milli Q autoclavada. Esta solução mãe foi diluída também em água Milli Q autoclavada, em quantidade suficiente para obter a solução de uso, cuja concentração final é de 10 pmol/ μ l.

O protocolo utilizado para PCR foi: 23 μ l de mix (Supermix, Invitrogen); 0,75 μ l de cada primer (25 μ M); 0,25 μ l de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 μ l do DNA extrado. Um volume total de 25 μ l foi submetido à amplificação, cujos parâmetros utilizados foram:

para *Babesia canis vogeli*:

1. Desnaturação Inicial: 94° C por 2 minutos;
 2. Desnaturação: 94° C por 30 segundos
 3. Anelamento: 56° C por 30 segundos;
 4. Extensão: 72° C por 30 segundos.
 5. Extensão: 72° C por 5 minutos.
- } 35 ciclos

Para *Rickettsia* spp.:

1. Desnaturação Inicial : 95o C por 3 minutos;
 2. Desnaturação: 95° C por 15 segundos
 3. Anelamento: 50° C por 30 segundos;
 4. Extensão: 72° C por 30 segundos.
 5. Extensão: 72° C por 7 minutos.
- } 40 ciclos

4.6.2 Análises dos produtos amplificados

Os produtos amplificados da reação de PCR foram visualizados com aparelho de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (150 ml TBE 0,5%; 1,75g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™), em cuba horizontal e tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0) submetida à voltagem de 1 a 10 V/cm durante 30 minutos. A revelação foi em solução de brometo de etídeo (0,5 ug/ml) e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.7 PESQUISA DE *Rickettsia* spp. NOS CARRAPATOS

4.7.1 Extração de DNA dos carrapatos

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Isotiocianato de Guanidina (GT) previamente modificado (CHOMKZYNSKI, 1993), onde cada carrapato foi colocado em um microtubo de 1500 µL contendo 150 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7.4) e triturado com ponteira queimada. Em seguida foi homogeneizado no vórtex por 10 segundos e centrifugado por 6 segundos. Foi então adicionado 450 µL de Isotiocianato de Guanidina, encubado por 10 minutos em temperatura ambiente homogeneizando brevemente no vórtex a cada 2 minutos. Posteriormente, 100 µL de clorofórmio foi acrescentados, fazendo a inversão deste por algumas vezes e deixando descansar por 2 minutos. O microtubo foi então centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos para separar a fase aquosa, a qual foi pipetada e

transferida para outro microtubo de 1500 µL previamente identificado. Posteriormente foi incorporados à fase aquosa 600 µL de isopropanol com incubação a -20°C de 2 a 18 horas. Após esse período o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm e 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e se adicionado 800 µL de etanol a 70%. Novamente o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o pellet no microtubo aberto secará a 56°C por 15 minutos no termobloco. O pellet foi ressuspendido em TE, de 30-60 µL de acordo com a necessidade, sendo incubado novamente, porém com o microtubo fechado, a 56°C por 15 minutos no termobloco. O microtubo foi armazenado a -20°C até sua utilização.

4.7.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A presença de riquetsia nos carrapatos coletados foi avaliada através da amplificação de um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de riquetsia, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), denominados de CS-62 (GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT) e CS-462 (CTT CCT TAA AAT TCA ATA AAT CAG GAT G) (LABRUNA et al., 2004). O gene da proteína externa de membrana A (*ompA*) foi utilizado para a confirmação da infecção por riquetsia empregando-se oligonucleotídeo iniciadores Rr190.70 (ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) e Rr190.602 (AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT) que amplifica um fragmento de 532 pb apenas em riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) (REGNERY et al. 1991).

4.7.3 Análises dos produtos amplificados

Os produtos amplificados da reação de PCR foram visualizados com aparelho de eletroforese em gel de agarose a 2% (100 ml TBE 0,5%; 2,0g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™).

4.7.4 Purificação e Seqüenciamento de Nucleotídeos

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation) e em seguida feita a reação de seqüenciamento com o kit comercial BigDye™ Terminator (Perkin Elmer) de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram seqüenciadas em seqüenciador automático (Applied Biosystems/PerkinElmer, Modelo ABI Prism 310 Genetic, CA, US) de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO

Antes da coleta das amostras sangüíneas e dos carrapatos foi preenchido um questionário (em anexo), visando obter informações sobre o estado de saúde dos animais, e informações específicas tais como: faixa etária, sexo, grupo racial, procedência dos cães (zona urbana e zona rural), presença de ectoparasitos e atividade de caça.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através de tabelas de contingências com as diferentes variáveis pelo teste Qui-quadrado, corrigidas por Yates, quando não possível, pelo teste Exato de Fisher e Qui-quadrado por Independência, utilizando-se o Programa Epi Info (CDC, versão 3.4.3). Associações entre variáveis e freqüência de soropositivos foram estimadas a partir do nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e pela Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança de 95%.

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA do Curso de Medicina Veterinária, conforme o protocolo nº 036/2009.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da população canina da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha- MA.

A população canina da área urbana e rural da microrregião de Chapadinha foi caracterizada segundo sexo, idade, raça e atividade de caça.

Do total de animais, 182 cães eram machos (56,7%), 93 da zona urbana e 89 da zona rural e 139 fêmeas (43,3%), sendo 79 da zona rural e 60 da zona urbana. Verificou-se que não houve diferença significativa em relação à proporção macho e fêmea, o que difere dos resultados relatados por Dias et al. (2004), que observou a preferência por machos, provavelmente, motivada pela crença, comumente disseminada, de que são melhores cães de guarda e pela dificuldade de evitar a prenhez das fêmeas, principalmente em animais não confinados.

Quanto à faixa etária, 86 (26,7%) da população canina apresentavam idade inferior a 12 meses. Animais com idade de um a três anos constituíam 58,1% (187) da população. Apenas 15,2% (9) dos cães tinham mais de 3 anos de idade. É provável que a pouca longevidade destes animais esteja relacionada às condições de criação, pois grande parte dos animais tinham acesso irrestrito a rua o que leva a risco mais alto de contágio de doenças e à morbimortalidade, concordando com Silva et al. (2010) que afirma que um dos fatores determinantes do risco sanitário a que os animais estão sujeitos refere-se ao nível de confinamento, somando a isso observa-se também o pouco índice de coberturas vacinais (39%).

Observou-se quanto ao tipo racial que 96,6% (311) dos animais eram sem raça definida (SRD) e um (0,3%) Basset Hound, três (0,9%) Poodle, dois (0,6%) Dálmata, um (0,3%) Pinscher, um (0,3%) Pitt Bull, um (0,3%) Pastor Belga e dois (0,6%) Pastor Alemão, constituindo um total de 11(3,4%).

Com relação ao acesso a rua observou-se que, no ambiente urbano, 98 (65,8%) cães tinham acesso livre à rua enquanto que 51 (34,2%) eram domiciliados. Quanto aos cães do ambiente rural, 161 (93,1%) tinham acesso livre à rua, enquanto 12 (6,9%) eram domiciliados (IC 95%: 0,07 – 0,29%).

Quanto à atividade de caça, observou-se que 39,9% dos cães da área rural exerciam essa atividade, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos animais da zona urbana (Tabela 1). Observa-se que animais da zona rural são em grande parte caçadores, isto possivelmente tem relação à classe econômica dos proprietários, que muitas vezes recorrem à caça como alternativa de alimentação ou lazer e os cães acabam acompanhando os proprietários nessa atividade.

TABELA 1- Cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha com atividade de caça, no período de março de 2010

Área	Cães				Total	OR	IC	P
	Caçadores		Não caçadores					
	N	%	N	%				
Urbana	16	10,7	133	89,3	149	0,18	0,09-0,34	0,0000000012 ^{a*}
Rural	69	39,9	104	60,1	173			

(^a) Fisher (*) Associação significativa

5.2 Carrapatos

O parasitismo por carrapatos foi encontrado em 193 (59,94%) dos 322 cães amostrados. As seguintes espécies foram identificadas: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma cajennense*.

Do total dos cães parasitados, 79 (40,93%) eram animais de áreas urbanas e 114 (59,06 %) provenientes de zona rural. Foram coletados no total 929 espécimes de carrapatos sendo o *R. sanguineus* a espécie mais numerosa, com 344 (37,03%) adultos e 21 (2,26%) ninfas em cães de áreas urbanas e 472 (50,82%) adultos e 29 (3,12%) ninfas em cães de áreas rurais. Quanto à espécie *A. cajennense* apenas dois adulto e uma ninfa (0,32%) foram encontrados nos cães de área urbana e trinta e um adultos (3,34%) foram encontrados nos cães de áreas rurais. Para a espécie *A. ovale*, encontrou-se somente exemplares adultos e em cães de áreas rurais totalizando 24 (2,58%) espécimes. Coletou-se 5 ninfas de *Amblyomma* sp., sendo uma ninfa(0,11%) na zona urbana e 4 (0,43%) da zona rural.

Nos municípios de Chapadinha e Anapurus houve maior presença de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Em Mata Roma, apenas um animal tinha uma ninfa de *Amblyomma* sp.

As espécies e ou gênero de carrapatos parasitando os cães de zona urbana e zona rural da microrregião de Chapadinha e respectivas freqüências, estão descritas na tabela 2.

TABELA 2- Carrapatos identificados em cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha, no período de março de 2010

ECTOPARASITOS	CÃES					
	Urbano		Rural		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>A. ovale</i>	-	-	1	0,53	1	0,53
<i>A. cajennense</i>	-	-	1	0,53	1	0,53
<i>R. sanguineus</i>	77	39,87	87	45,07	164	84,94
<i>R. sanguineus</i> X <i>A. cajennense</i>	1	0,53	11	5,70	12	6,23
<i>R. sanguineus</i> X <i>A. ovale</i>	-	-	10	5,18	10	5,18
<i>R. sanguineus</i> X <i>A. cajennense</i> x ninfa de <i>Amblyomma</i> sp.	1	0,53	2	1,03	3	1,56
Ninfa de <i>Amblyomma</i> sp.	-	-	2	1,03	2	1,03
TOTAL	79	40,93	114	59,07	193	100

N= número

O *R. sanguineus* é um carrapato que foi introduzido no Brasil com a colonização e tem estreita relação com o cão doméstico (SZABÓ et al., 2005). Como observado neste trabalho, esta espécie domina infestações em áreas urbanas, o que concorda com trabalhos já descritos (SZABÓ et al., 2001; SZABÓ et al., 2010). Infestações por esta espécie de carrapato já tinha sido descrita por Guerra & Brito (2004) na cidade de São Luís – MA.

Na zona urbana dois animais foram infestados por *A. cajennense*. A fonte destes carrapatos deve ser atribuída ao acesso freqüente destes animais a mata, uma vez que segundo relatos dos proprietários esses são animais de caça, concordando com Szabó et al. (2001) que afirmam que se o cão está em local permissivo para o desenvolvimento destas espécies, ou se este se

encontra em contato com outros animais, hospedeiros preferenciais, a infestação acontece.

É importante ressaltar que tanto *R. sanguineus* como *A. cajennense* são reconhecidas como vetores de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa no Brasil e em outros países da América Latina (MORAES-FILHO et al., 2009; PADDOCK et al., 2008).

Na zona rural, identificou-se carrapatos das espécies *R. sanguineus*, *A. cajennense*, *A. ovale* e ninfa de *Amblyomma* sp. Esses resultados se assemelham com os encontrados por Szabó et al. (2010) que identificaram carrapatos de cães da zona urbana e rural de Uberlândia- MG e encontraram *R. sanguineus* e *A. cajennense* parasitando cães de zona urbana e rural e *A. ovale*, ninfas e larvas de *Amblyomma* sp. e ninfas de *Boophilus microplus*, em cães de zona rural.

A prevalência de *R. sanguineus* superou a de espécies do gênero *Amblyomma*, concordando com Rodrigues et al. (2008) que encontraram resultados similares em cães de áreas rurais em Juiz de Fora-MG., justificando a maior prevalência de *R. sanguineus* em detrimento das espécies do gênero *Amblyomma*, pelo fato de um número considerável de cães terem seus locais de repouso junto às residências dos proprietários favorecendo assim, infestações por *R. sanguineus* que apresenta hábito nidícola. Neste estudo, este fato justifica-se por que o ambiente de casa com quintal, gera uma condição ecológica que favorece o parasitismo por *R. sanguineus* e de formas imaturas deste ixodídeos.

Segundo O'Dwyer et al. (2001) as espécies do gênero *Amblyomma* são mais freqüentemente encontradas em cães que vivem em área rural. SHIMADA et al. (2003), relataram que *R. sanguineus* foi mais associado a infestações em áreas urbanas e suburbanas. Szabó et al. (2001) observaram ocorrência de *R. sanguineus* tanto em cães de áreas urbanas quanto rurais.

Ressalta-se que este achado corresponde ao primeiro registro de infestação por carrapatos do gênero *Amblyomma* na espécie canina no Maranhão, porém *A. cajennense* já foi encontrado na Ilha de São Luís- MA por Guerra & Brito (2004), parasitando suínos.

Quanto ao tipo de infestações observou-se que 77(39,90%) e 90(6,63%) dos animais tinham infestações simples para zona urbana e rural, respectivamente. Para infestações mistas, apenas 2(1,03%) cães da zona urbana e 24(12,44%) na zona rural estavam parasitados.

Estes resultados, quando comparados pelo teste do χ^2 , verificam-se associação significativa ($p < 0,05$), apenas para infestação mista sendo que, animais da zona rural apresentaram maior frequência, 12,44% de animais infestados e zona urbana foi considerado um fator de proteção para infestação (OR=0,08) (Tabela 3).

TABELA 3- Tipo de infestação por carrapatos em cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

	Infestação Mista		total	OR	IC	Total
	Infestado	Não Infestado				
Zona Urbana	2 1,34%	147 98,66%	149	0.08	0,01- 0,38	0,0000923 ^{a*}
Zona Rural	24 13,87%	149 86,13%	173			

(a) Teste de Fisher (*) Associação significativa OR =Odds ratio

A presença de infestação mista em cães de áreas rurais neste estudo está relacionada à forma de criação destes cães, onde parte do dia estão soltos tendo dessa forma acesso livre a áreas de matas e outros ambientes diferentes do domicílio e do peridomicílio onde se expõe a ectoparasitos de diversos animais que freqüentam aquela área, principalmente carrapatos do gênero *Amblyomma* e no momento de repouso são presos, onde passam algumas horas do dia. Segundo Labruna et al. (2001) embora *R. sanguineus* seja um carrapato adaptado às condições das áreas urbanas, algumas formas de criação de cães em áreas rurais possibilitam o seu estabelecimento nessas áreas, isto porque nas áreas rurais a disponibilidade de habitats para as fases de vida livre do *R. sanguineus* é limitada, ficando concentrada às instalações feitas pelo homem, onde os cães soltos tendem a passar algumas horas do dia, contribuindo dessa forma para a manutenção de populações de *R. sanguineus* nas áreas rurais.

Quanto ao controle de ectoparasitos nos cães, observou que apenas 98 (31,9%) realizam ou realizaram este procedimento, sendo este direcionado apenas ao hospedeiro, não se observando preocupação por parte dos proprietários em manterem o ambiente livre de abrigos para as formas imaturas dos carrapatos. De fato, os cães amostrados, mesmo os que eram submetidos ao controle, apresentaram considerável nível de infestação, o que demonstra que este deve ser direcionado, no caso de *R. sanguineus*, principalmente ao ambiente, onde se encontram 95% da população de carrapatos (LABRUNA et al., 2004) ao passo que em *A. cajennense*, o manejo de vegetação influencia sobremaneira o controle (OLIVEIRA, 2004).

Com relação à atividade de caça desenvolvida pelo animal e o tipo de infestação, observa-se que houve associação significativa ($p < 0,05$) para animais que exercem atividade de caça, com frequência de 69,2 %. Os animais não exercerem atividades de caça foi considerado um fator de proteção para infestação mista (OR= 0,09). (Tabela 4).

TABELA 4 – Atividade de caça exercida pelos cães da zona urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Cães								
Tipo de infestação	Caçadores N	Caçadores %	Não caçadores N	Não caçadores %	Total	OR	IC	P
Simplex	27	16,2	140	83,8	167	0,09	0.03-0,24	0,0000000777 ^{a*}
Mista	18	69,2	8	30,8	26			

(^a) Teste de Fisher (*) Associação significativa OR =Odds ratio

Os cães que vivem principalmente em áreas rurais tem contato maior com animais silvestres, através da atividade de caça, aumentando assim a possibilidade de contato com carrapatos silvestres, ou ao contrário, modificando o ambiente natural com a introdução de carrapatos de animais domésticos, permitindo um intercâmbio de agentes patogênicos e o surgimento de novas doenças. Esses resultados concordam com e Labruna et al. (2000), que afirmam que em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma* infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas.

5.3 Imunofluorescência indireta (RIFI) para *Babesia canis*

Dos 322 soros de cães testados, 52 (16,1%) mostraram reatividade ao antígeno de *Babesia canis* pela RIFI.

No que se refere aos diferentes locais de coleta, 33 (63,46%), dos cães soropositivos eram provenientes de zona urbana e 19 (36,54%) da zona rural, verificando-se associação significativa ($p < 0,05$), onde animais da zona rural tiveram um risco menor de se infectar (OR= 0,43). (Tabela 5).

A soroprevalência de *B. canis* (16,1%) na microrregião de Chapadinha estabelecida no presente estudo diferiu dos encontrados nos estados de Belo Horizonte (66,92%), Paraná (37,7%), São Paulo (67,7%) e Minas Gerais (73,3%) (RIBEIRO et al., 1990; TRAPP et al., 2006; FURUTA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009). Entretanto, foi semelhante aos resultados de Maia et al. (2007) na cidade de Porterinha- MG que encontraram uma prevalência de 18,8%, sugerindo que a diferença na transmissão da babesiose dentro de diferentes regiões do Brasil está relacionada com as variantes de carrapatos ixodídeos encontrados nestas áreas, uma vez que Pegram et al. (1987) demonstraram que entre as espécies de *R. sanguineus* originário de diferentes regiões neotropicais, existem consideráveis variações genéticas, morfológicas e biológicas, e que as posições taxonômicas das muitas variantes de *R. sanguineus* são controversas, além disso, diferenças biológicas e morfológicas entre as espécies *R. sanguineus* foram também encontrados em exemplares coletados na Argentina e no Brasil (OLIVEIRA et al., 2005;. SZABÓ et al., 2005).

TABELA 5- Frequência de anticorpos anti –*Babesia canis* em soro de cães na área urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Área	Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P
	N	%	N	%				
Urbana	33	22,1	116	77,9	149	0,43	0,22 -0,83	0,0103 ^{a*}
Rural	19	11	154	89	173			

(^a) Qui- Quadrado (*) Associação significativa OR =Odds ratio

A prevalência maior de animais sorologicamente positivos em áreas urbanas pode ser explicada pela alta prevalência do vetor *R. sanguineus*. Esse resultado está de acordo com Passos et al. (2005), que afirmam que as elevadas taxas de infecção por *Babesia* spp. nas áreas urbanas em regiões tropicais se deve às condições ambientais presentes no desenvolvimento e manutenção de populações do vetor *R. sanguineus*.

A presença de cães do ambiente rural com títulos de anticorpos anti-*B. canis* demonstram que apesar da presença deste parasito neste ambiente, houve prevalência muito baixa indicando que essa enfermidade realmente não é um problema em cães de áreas rurais, considerando que quase metade dos animais infestados por carrapatos estavam parasitados com *R. sanguineus*. Entretanto, deve-se considerar que, como os cães de áreas rurais têm menos contato com este protozoário não há o desenvolvimento de imunidade efetiva, esta área torna-se um ambiente instável para a infecção, já que, cães que não adquirem imunidade à infecção por *Babesia* podem ser predispostos a apresentar sinais clínicos se infectados, como afirmam O'Dwyer et al. (2009).

Em relação aos três municípios incluídos no estudo (Anapurus, Chapadinha e Mata Roma), observa-se que *B. canis* é um patógeno que se encontra difundido entre os cães na microrregião de Chapadinha, entretanto não se verificou associação significativa ($p > 0,05$) para a infecção nestas três localidades, sendo que, Anapurus apresentou maior frequência, 38,5% de amostras reagentes e Chapadinha menor frequência, 28,8%.

Na figura 2, registra-se a distribuição dos títulos de anticorpos anti-*B. canis* em amostras séricas de cães. Em relação aos títulos verificou-se que variaram de 40 a 640 obtendo-se 32,7% (17/52) de amostras reagentes para título de 40 e 15, 40% (8/ 52) apresentaram títulos de 80, 320, 640 e 21,20%(11/52) para títulos de 160.

É importante ressaltar que um resultado positivo na sorologia não indica necessariamente infecção e sim uma exposição prévia do animal ao agente etiológico, entretanto pela titulação dos anticorpos, constatou-se que 15,40% dos cães apresentaram títulos igual 640, indicando que estes animais sofreram uma infecção recente.

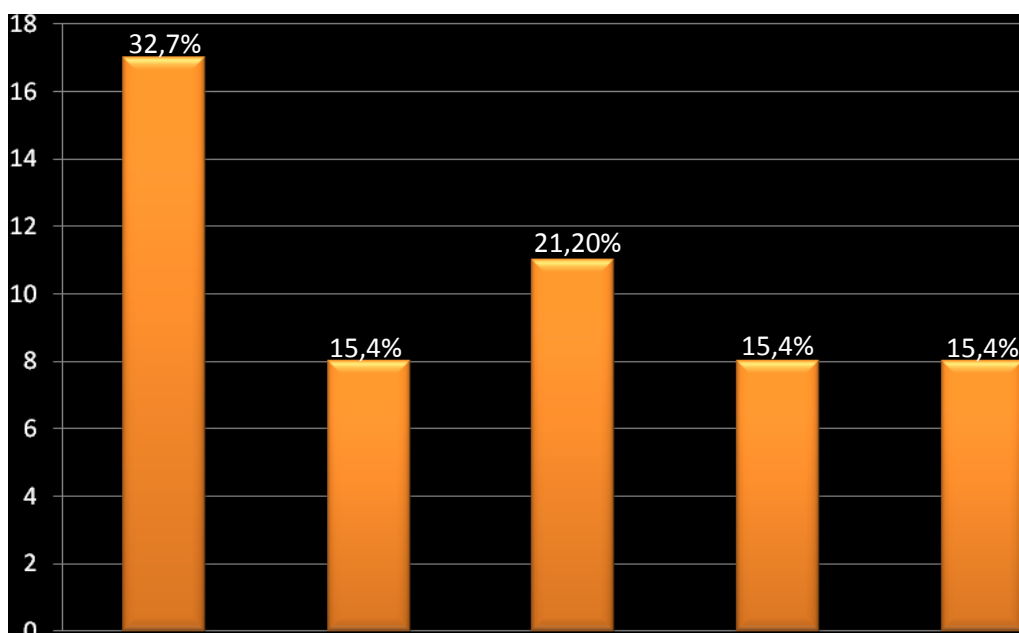


FIGURA 2 - Frequência de anticorpos anti- *Babesia canis* em soros de cães (n=322), da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.

A ausência de associação ($p > 0,05$) entre soropositividade e as variáveis sexo e faixa etária (Tabela 6), demonstra que os animais, independentemente do sexo e da faixa etária, tiveram oportunidades iguais para se infectarem com *B. canis*, confirmando que a idade e o sexo não são fatores de risco para a infecção. Achados estes concordantes com a maioria dos estudos epidemiológicos realizados para babesiose canina (GUIMARÃES et al., 2002; MAIA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009).

Em relação ao grupo racial houve associação significativa ($p < 0,05$) para animais com raça definida, apresentando frequência de 54,54%. Dessa forma, os cães com raça definida apresentaram maior chance (OR=6,91) de contrair a infecção quando comparados aos cães sem raça definida, contrariando a maioria dos trabalhos (MAIA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009; COSTA- JÚNIOR et al., 2009) nos quais os cães sem raça definida apresentaram maior prevalência de infecção por *B.canis*. Esses dados sugerem que esta maior susceptibilidade pode está associada ao tipo de manejo que cada raça é submetida, favorecendo ou não a exposição ao carrapato, já que Yamane et al. (1994) afirma que sob o mesmo manejo,

eliminando-se as particularidades inerentes à rotina diária de atividades as quais os cães são submetidos, provavelmente não seriam observadas diferenças de susceptibilidade de acordo com as raças.

TABELA 6 - Distribuição da freqüência das variáveis sexo, faixa etária e grupo racial em cães soropositivos para *Babesia canis* da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Variável		Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P
		N	%	N	%				
Sexo	F	18	12,86	122	87,14	140	0,64	0,33-1,24	0,2094
	M	34	18,68	148	81,32	182			
Raça	Definida	6	54,54	5	45,45	11	6,91	1,77-27,48	0,0033 ^a
	Indefinida	46	14,46	265	85,54	311			
Faixa etária	< 1 ano	12	13,95	74	86,05		0,82	0,37-1,77	0,7083
	1 - 3 anos	31	16,58	156	83,42				
	> 3 anos	9	18,37	40	81,63		0,88	0,37- 2,18	0,9335
Presença de carrapatos	Sim	25	13,3	163	86,7		0,61	0,32-1,15	0,1353
	Não	27	20,1	107	79,9				

(M) machos (F) fêmeas (a) Exato de Fisher (*) Associação significativa OR=Odds ratio IC= Intervalo de Confiança

No presente estudo a presença de carrapatos nos cães não foi associada estatisticamente a presença de anticorpos por *B. canis* nos animais amostrados. Isto pode ter ocorrido pelo baixo número de animais sorologicamente positivos, demonstrando um menor número de carrapatos portadores de *Babesia* spp. Estes dados apontam para a necessidade de mais estudos envolvendo amostragens maiores do vetor, incluindo variações sazonais e dados sobre as fases clínicas da doença nos cães amostrados, uma vez que sabe-se que, em áreas endêmicas a aplicação da RIFI é limitada pela possibilidade de ocorrer resultados falso-negativos nos estágios iniciais da infecção (BICALHO et al., 2004).

Apesar da babesiose canina ser uma enfermidade que possui distribuição cosmopolita, os dados que se referem à prevalência de anticorpos anti-*B. canis* são escassos no Maranhão. No país, os poucos estudos

referentes à epidemiologia desses parasitas são realizados em sua maioria em cães de áreas urbanas. Poucos estudos realizaram a pesquisa desse agente em cães de áreas rurais (COSTA JÚNIOR et al., 2009; O'DWYER et al., 2009). Dessa forma, esse estudo constitui a primeira investigação de babesiose canina em zona rural no Maranhão.

5.4 Imunofluorescência indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis*

Dos 322 soros de cães testados, 47 (14,6%) mostraram reatividade ao antígeno de *Ehrlichia canis* pela RIFI.

A prevalência de *E. canis* (14,6%) na microrregião de Chapadinha foi similar àquela encontrada por Macieira et al. (2005) no Rio de Janeiro (15%), estando abaixo das relatadas por outros autores no Brasil: 23% no Paraná (TRAPP et al., 2006), 37,9% em Rondônia (AGUIAR et al., 2007), 36% na Bahia (CARLOS et al., 2007), 42% em Cuiabá (UENO et al., 2009), 35,6% na Bahia (SOUZA et al., 2010) e acima dos encontrados por Saito et al. (2008) no Rio Grande do Sul (4,8%).

A diferença observada nas frequências de cães soropositivos entre os diversos estudos pode ser atribuída, dentre outros fatores, a padronização da RIFI, principalmente no ponto de corte determinado por cada estudo (variando de 1:20 a 1:80), além da diversidade de modelos experimentais e protocolos de diagnóstico utilizado pelos autores, e fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da erliquiose nas regiões estudadas.

No que se refere aos diferentes locais de coleta, 19 (12,8%), dos cães soropositivos eram provenientes de zona urbana e 28 (16,2%) da zona rural. Estes resultados, quando comparados pelo teste do X^2 , verificou-se que não houve associação significativa ($p < 0,05$), entre essas duas variáveis. (Tabela 7).

No presente estudo, foi observado ocorrência de anticorpos anti-*E. canis* em 12,8% dos cães urbanos. Esses cães eram parasitados quase que exclusivamente pela espécie *R. sanguineus*. Segundo Trapp et al. (2006), o

parasitismo por *R. sanguineus* tem sido apontado como principal fator de risco para a erliquiose monocítica canina.

TABELA 7- Frequência de anticorpos anti –*Ehrlichia canis* em soro de cães na área urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Área	Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P
	N	%	N	%				
Urbana	19	12,8	130	87,2	149	1,32	0,67-2,60	0,4766
Rural	28	16,2	145	83,8	173			

(^a) Qui- Quadrado (*) Associação significativa OR =Odds ratio

Carlos et al. (2007), que afirmam que o ambiente rural, cuja situação socioeconômica dificulta o controle do vetor com os cães facilmente infestados por carrapatos, apresenta maior risco de infecção por *E. canis*. Dessa forma, explica-se a presença de sorologia positiva em cães da zona rural (16,2%) neste estudo. Esses resultados concordam dos encontrados por Silva et al. (2010) que não observaram diferença significativa entre os cães com livre acesso à rua e/ou com acesso à zona rural . Contudo, Aguiar et al. (2007) verificou maior prevalência nos cães urbanos do que nos cães rurais ($p < 0,05$), atribuindo esse fato a ocorrência de pouca infestação por *R. sanguineus* em animais nessa área.

Costa-Júnior et al.(2007) estudando soroprevalência e fatores de riscos em áreas rurais do estado de Minas Gerais acharam uma prevalência de 44,7% sugerindo que os cães que vivem nas zonas rurais estão mais expostos a carrapatos vetores que aqueles que vivem em áreas urbanas associando esse fato de que nos cães que vivem em áreas urbanas é mais provável o uso de acaricidas do que em cães de zona rural, pois nestes raramente são usados acaricidas e sim procede-se á catação. Os autores sugerem ainda que o carrapato *A. cajennense* deve ser incluído como um vetor potencial de *E. canis* em áreas rurais do Brasil.

Em relação aos três municípios incluídos no estudo (Anapurus, Chapadinha e Mata Roma), não se verificou associação significativa ($p > 0,05$) para a infecção por *E. canis*, sugerindo que esses animais tiveram oportunidade iguais de se infectarem, em qualquer uma destes municípios.

Na figura 3, registra-se a distribuição dos títulos de anticorpos anti – *E. canis* em amostras séricas de cães, com títulos que variaram de 80 a 163.480.

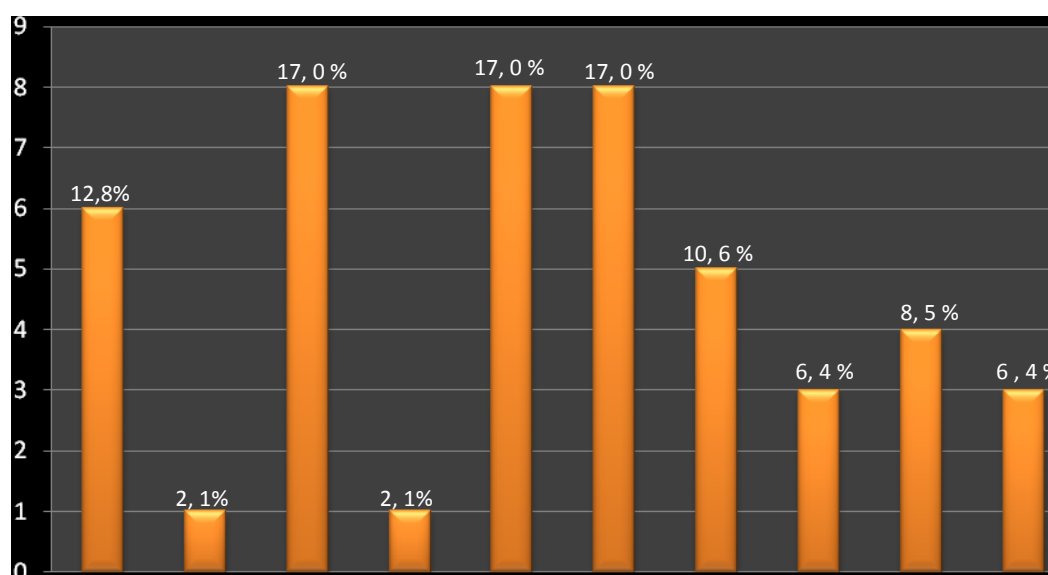


FIGURA 3 - Frequência de anticorpos anti- *Ehrlichia canis* em soros de cães (n=322), da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010.

A presença de cães do ambiente urbano e rural com altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* associada ao fato dos animais não apresentarem sintomatologia compatível com a doença, levam à conclusão que os animais soropositivos tiveram contacto prévio com os agentes, recuperando-se da infecção.

É importante observar que as bactérias do gênero *Ehrlichia* induzem resposta humoral específica, base para o diagnóstico sorológico (RIKIHISA, 1991), ocorrendo soroconversão nos animais logo após a infecção (OTRANTO et al., 2009). Dessa forma, a presença de altos títulos de anticorpos circulantes para *E. canis*, não significa que o animal está com o a infecção no momento da

coleta mas que tiveram um estímulo antigênico através do contato com o parasito e que este circula na região em estudo.

Não foi observada associação entre a taxa de infecção e a faixa etária (Tabela 8), corroborando com Aguiar et al. (2007) em Rondônia, Carvalho et al. (2008) em Salvador e Silva et al. (2010) em Mato Grosso que afirmam que a faixa etária do animal não é um fator de risco pra *E. canis*, no entanto, Ueno et al. (2009) estudando uma população de cães atendidos em hospital veterinário em São Paulo encontrou uma maior freqüência (65%) da infecção em cães com idade até 12 meses indicando maior risco dos animais contraírem a infecção nessa faixa etária, contudo Costa-Júnior et al. (2007) relata que animais mais velhos estão mais susceptíveis a infecção uma vez aumenta a chance do animal ser exposto a infecção com o tempo.

TABELA 8 - Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária e grupo racial em cães soropositivos para *Ehrlichia canis* da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Variável		Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P
		N	%	N	%				
Sexo	F	18	12,9	122	87,1	140	1,10	0,52-2,34	0,5378
	M	29	15,9	153	84,1	182			
Raça	Definida						1,10	0,52-2,34	0,9225
	Indefinida								
Faixa etária	< 1 ano	14	16,3	72	83,7	86	1,55	0,53-4,87	0,5316
	1 - 3 anos	28	15	159	85	187			
	> 3 anos	5	10,2	44	89,8	49			
Presença de carrapatos	Sim	2	13,5	167	86,5	193	0,80	0,41-1,56	0,5904
	Não	21	16,3	108	83,7	129			

(M) machos (F) fêmeas (a) Exato de Fisher (*) Associação significativa OR=Odds ratio IC= Intervalo de Confiança

A ocorrência de anticorpos anti-*E. canis*, quando avaliada segundo o sexo, não apresentou diferença entre machos e fêmeas, dessa forma o sexo

parece não ter importância epidemiológica na infecção por *E. canis* como afirmado em estudos anteriores por Aguiar et al. (2007) e Silva et al. (2010).

Em relação ao grupo racial não foi verificada associação significativa ($p > 0,05$). Estudos conduzidos por Costa-Júnior et al. (2007) relatam que cães sem raça definida nas zonas rurais estão mais susceptíveis a infecção por serem os animais preferidos para a rotina de trabalho, estando mais predisposto ao carrapato vetor, dessa forma Sainz et al. (1996) relatam não haver diferenças entre as raças, mas sim uma associação entre a ocupação do cão e soropositividade a *E. canis*.

Neste estudo a presença de carrapatos nos cães não foi associada estatisticamente a infecção por *E. canis* nos animais amostrados, concordando com resultados de Ueno et al. (2009). Considerando que os cães não exibiam sinais clínicos da doença, uma parte dos animais infectados poderia ter evoluído para a cura, conservando títulos detectáveis de anticorpos anti-*E. canis*. Entretanto, *R. sanguineus* permanece como o principal transmissor e fator de risco para a infecção por *E. canis* em cães no Brasil (TRAPP et al., 2006; AGUIAR et al., 2007), fato reforçado em estudo que relatou a ausência de *E. canis* infectando outras espécies de carrapatos no Brasil que não *R. sanguineus* (LABRUNA et al., 2007).

5.5 Imunofluorescência indireta (RIFI) para *Rickettsia* spp.

Das 322 amostras testadas pela RIFI para *Rickettsia* spp., 61 (18,9%) continham anticorpos que reagiram para algum tipo de *Rickettsia*. Ao se considerar a utilização de antígenos de diferentes espécies, os animais mostraram-se reagentes para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* e *R. amblyommii*. Conforme interpretações previamente padronizadas por Labruna et al. (2007), no qual para uma espécie ser homóloga a uma dada espécie de *Rickettsia* o título apresentado por ela deve ser pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies, determinou-se *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela infecção natural

de 12 amostras de soros (19,67%) com títulos que variaram de 1: 64 à 1: 4096, conforme tabelas 10, 11 e 12.

A prevalência de cães sororreativos encontrada no presente trabalho (18,9%) é considerado expressivo, quando se compara com resultados de prevalência obtidos de área não endêmica, como os encontrados por Silva et al. (2010) em Belo Horizonte (0,66%), entretanto, quando se compara com resultados encontrados no Sul do país observa-se que houve uma menor prevalência (42,4%) (SAITO et al., 2008). Estudos de prevalência de anticorpos para *Rickettsias* do GFM em cães de área endêmica nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo registraram resultados que variam entre 8% a 69,6% (LEMOS et al., 1994; LEMOS et al., 1996; PINTER et al., 2008).

O estudo sorológico de cães como possíveis animais sentinelas para a FMB na região do Baixo Parnaíba através da técnica da RIFI sugere a presença de atividade riquetsial com presença de *Rickettsia* do grupo da Febre maculosa. Porém, se faz necessário maiores estudos nesta área, pois Magnarelli et al. (1981) sugerem que deve haver uma correlação entre positividade nos vetores, hospedeiros e reservatórios para que se confirme atividade riquetsial local.

O presente trabalho é o primeiro estudo de soroprevalência de infecção por *Rickettsia* spp. em cães no Maranhão. Até então, a maioria dos estudos sorológicos sobre prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em hospedeiros amplificadores havia se concentrado em áreas endêmicas relatado na região Sudeste do Brasil que inclui os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo, onde a ocorrência de casos fatais se apresenta freqüente. A escolha do Maranhão foi oportuna, pois ainda que não tenham casos registrados de FMB em humanos neste estado, já há relatos com notificações registradas em estados da região nordeste como Bahia (SILVA et al., 2011).

Em relação aos três municípios incluídos no estudo (Anapurus, Chapadinha e Mata Roma), observou-se que Mata Roma apresentou maior freqüência, 31,3% de amostras reagentes e Anapurus menor freqüência, 2%. Verificou-se associação significativa ($p < 0,05$), entre Anapurus e os municípios

de Chapadinha e Mata Roma, não havendo diferença significativa entre Chapadinha e Mata Roma.

Silva et al. (2010) afirmam que para que haja ocorrência de rickettsiose é necessário que a cidade reúna condições epidemiológicas tais que proporcionem um potencial biótico, como exemplo numerosa população canina, que vai possibilitar estreito convívio entre pessoas, animais e carrapatos. Além do mais, em relação ao vetor, há ainda outros aspectos a serem considerados na epidemiologia que são presença de hospedeiros primários e condições ambientais favoráveis às fases de vida livre do carrapato. Neste aspecto a latitude, temperatura e tipo de cobertura vegetal influenciam no estabelecimento do vetor (EVANS et al., 2000). Nesse estudo, a diferença entre Anapurus e as outras dois municípios são desconhecidas, já que observa-se que os três municípios reúnem potencial biótico para o estabelecimento do vetor e a presença de animais sororeagentes condizem com circulação de *Rickettsias* do grupo da febre maculosa, evidenciando a vulnerabilidade da região.

TABELA 9- Frequência de anticorpos anti –*Rickettsia* spp. em soro de cães nos municípios de Anapurus, Chapadinha e Mata Roma, Maranhão, Brasil

Município	Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P
	N	%	N	%				
Anapurus	2	2	98	98	100 ^b	-	-	-
Chapadinha	28	22,8	95	77,2	123 ^c	0,07	0,01-0,31	0,0000155 ^{a*}
Mata Roma	31	31,3	68	68,7	99 ^c	0,04	0,01-0,20	0.0000001 ^{a*}

(^a) Qui- Quadrado (*) Associação significativa OR =Odds ratio

(^{b, c}) Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

No inquérito sorológico realizado em Anapurus de um total de 100 cães testados por RIFI para cinco espécies de *Rickettsia* apenas 2 (2%) animais reagiram de forma cruzada para *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. belli*, sem reagir para *R. parkeri* e *R. rickettsii*. Dessa forma, baseando-se nos estudos de HORTA et al. (2004) e LABRUNA et al. (2007), não há como indicar

um provável agente causador da resposta imune, uma vez que nenhuma espécie apresentou título pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies.

TABELA 10- Imunofluorescência Indireta para *Rickettsia* spp., em cães do município de Anapurus, Maranhão, Brasil

Títulos finais de reatividade para antígenos de <i>Rickettsia</i>							
Soro de cão	Localidade	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>	Antígeno provável
105	Anap./Urbana	NR	NR	64	64	128	
128	Anap./Urbana	NR	NR	256	128	NR	

NR = Não reagente

No município de Chapadinha de um total de 123 cães testadas por RIFI para cinco espécies de *Rickettsia*, 28 (22,8%) animais apresentaram soros que reagiram de forma cruzada para algum tipo de *Rickettsia*. Destes 9 reagiram soro-específico para *R. amblyommii* ou uma espécie estreitamente relacionada e 19 reagiram de forma cruzada para *R. rhipicephali*, *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. parkeri* e *R. rickettsii*. (Tabela11).

Para o município de Mata Roma verificou-se que de um total de 99 cães testadas por RIFI para cinco espécies de *Rickettsia*, 31 (31,3%) animais apresentaram soros que reagiram de forma cruzada para algum tipo de *Rickettsia*. Destes, apenas 3 animais reagiram soro-específico para *R. amblyommii* ou uma espécie geneticamente relacionada e 28 reagiram de forma cruzada para *R. rhipicephali*, *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. parkeri* e *R. rickettsii* (Tabela12).

Observa-se que 18,9% dos cães apresentaram soros reagentes para *Rickettsia* spp., nos quais pelo menos 12 tinham evidências sorológicas de infecção por *R. amblyommii* ou uma espécie geneticamente relacionada. A distribuição geográfica desses 12 cães abrangeu os municípios de Chapadinha e Mata Roma e embora não se podendo determinar o provável antígeno envolvido na infecção, no município de Anapurus, os dois animais reagentes tiveram títulos compatíveis com *R. amblyommii*, sugerindo uma ampla distribuição desta espécie de *Rickettsia* na mesorregião do leste maranhense.

TABELA 11- Imunofluorescência Indireta para *Rickettsia* spp., em cães do município de Chapadinha, Maranhão, Brasil

Títulos finais de reatividade para antígenos de <i>Rickettsia</i>							
Soro de cão	Localidade	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>	Antígeno provável
8	Chap./Urbana	128	NR	256	128	NR	
27	Chap./Urbana	NR	128	128	NR	NR	
51	Chap./Urbana	NR	NR	128	128	NR	
53	Chap./Rural	NR	NR	128	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>
54	Chap./Rural	NR	NR	128	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>
55	Chap./Rural	NR	NR	4096	1024	NR	<i>R. amblyommii</i>
56	Chap./Rural	256	128	4096	1024	NR	<i>R. amblyommii</i>
59	Chap./Rural	NR	NR	2048	1024	NR	
60	Chap./Rural	NR	NR	128	64	NR	
61	Chap./Rural	NR	NR	512	256	NR	
62	Chap./Rural	NR	NR	512	64	NR	<i>R. amblyommii</i>
63	Chap./Rural	256	128	2048	1024	256	
65	Chap./Rural	NR	NR	2048	2048	NR	
69	Chap./Rural	128	128	4096	2048	128	
70	Chap./Rural	NR	NR	256	128	NR	
74	Chap./Rural	512	128	256	128	128	
75	Chap./Rural	128	128	256	256	NR	
76	Chap./Rural	NR	NR	128	128	NR	
78	Chap./Rural	128	64	256	64	NR	
79	Chap./Rural	NR	NR	128	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>
82	Chap./Rural	NR	NR	256	128	NR	
83	Chap./Rural	NR	128	256	256	NR	
84	Chap./Rural	NR	NR	4096	1024	NR	<i>R. amblyommii</i>
85	Chap./Rural	128	256	2048	2048	64	
86	Chap./Rural	NR	NR	512	256	NR	
87	Chap./Rural	NR	NR	256	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>
88	Chap./Rural	NR	NR	128	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>
89	Chap./Rural	NR	NR	256	128	NR	

NR = Não reagente

As reações específicas de amostras caninas contra *R. amblyommii* constituem os primeiros indícios de que essa bactéria esteja circulando no Maranhão, estado antes do presente estudo considerado indene a esta bactéria. Provavelmente, esteja sendo mantida em ciclo silvestre por algum animal adaptado às condições de hospedeiro. Esse achado é de grande importância, pois segundo Silva et al. (2010) os cães são animais próximos dos humanos e podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da febre maculosa.

TABELA 12- Imunofluorescência Indireta para *Rickettsia* spp., em cães do município de Mata Roma , Maranhão, Brasil

Títulos finais de reatividade para antígenos de <i>Rickettsia</i>							
Soro de cão	Localidade	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>	Antígeno provável
202	M. Roma/Rur	-	-	128	-	-	<i>R. amblyommii</i>
204	M. Roma/Rur	-	-	2048	1024	128	
205	M. Roma/Rur	-	-	4096	2048	-	
206	M. Roma/Rur	-	-	256	64	256	
207	M. Roma/Rur	256	64	4096	2048	256	
209	M. Roma/Rur	128	128	1024	1024	-	
210	M. Roma/Rur	-	64	4096	2048	-	
211	M. Roma/Rur	-	-	256	128	-	
213	M. Roma/Rur	64	256	512	512	-	
215	M. Roma/Rur	128	256	4096	2048	-	
216	M. Roma/Rur	64	128	512	128	64	<i>R. amblyommii</i>
218	M. Roma/Rur	128	128	256	256	-	
219	M. Roma/Rur	-	128	512	512	-	
221	M. Roma/Rur	512	512	2048	1024	128	
222	M. Roma/Rur	-	-	2048	1024	64	
223	M. Roma/Rur	512	512	2048	1024	-	
224	M. Roma/Rur	512	512	2048	2048	-	
225	M. Roma/Rur	256	256	4096	1024	256	<i>R. amblyommii</i>
228	M. Roma/Rur	-	-	512	512	-	
229	M. Roma/Rur	128	128	512	512	256	
232	M. Roma/Rur	1024	512	256	512	256	
233	M. Roma/Rur	512	256	4096	2048	-	
234	M. Roma/Rur	512	128	2048	1024	-	
235	M. Roma/Rur	128	-	128	128	-	
236	M. Roma/Rur	128	-	512	128	256	
237	M. Roma/Rur	256	512	1024	1024	256	
238	M. Roma/Rur	256	256	1024	1024	256	
239	M. Roma/Rur	256	128	512	256	128	
240	M. Roma/Rur	512	128	512	256	512	
241	M. Roma/Rur	-	-	512	512	-	
242	M. Roma/Rur	-	64	512	512	-	

NR = Não reagente

Considerando que o cão é um animal sentinela para FM e que convivem próximos a seres humanos e com a fauna sinantrópica regular, podem ser importantes disseminadores de bactérias do grupo da febre maculosa, uma vez que podem carrear vetores infectados para áreas indenes.

Os expressivos títulos obtidos nestas amostras sugerem a possibilidade do animal ter sofrido infecção recente. No entanto, pode-se apenas afirmar que tem havido contato entre esses indivíduos e a(s) bactéria(s) do GFM ou microrganismo antígenicamente semelhante, e que os cães, devem ser uma sentinela eficiente para a infecção humana por *R. amblyommii*, ainda que se desconheça a patogenicidade desta bactéria para esta espécie animal.

Em estudos anteriores realizados em Monte Negro, oeste da Amazônia, com base em provas sorológicas Labruna et al. (2007) chegaram a conclusão de que pelo menos três espécies de *Rickettsia* acometem cães nesta região: *R. parkeri*, *R. Amblyommii* e *R. rhipicephali*. No presente estudo a presença *R. amblyommii* sugere que esta bactéria está amplamente difundida na região amazônica e nordeste do Brasil, já que o Maranhão encontra-se numa área de transição com vários biomas, entre eles amazônia legal e cerrado (alvo desse estudo).

Estes resultados diferem dos encontrados por Otomura et al. (2010) que encontraram ausência de anticorpos contra *Rickettsias* do GFM nos cães, encontrando apenas uma baixa prevalência em eqüinos no Paraná, sugerindo que na área em que o estudo foi realizado, a probabilidade de infecção humana é baixa.

É importante ressaltar que mesmo que não haja na literatura prova científica que a indique como patogênica para seres humanos, *R. amblyommii* já foi incriminada como possível agente causador da doença febril em seres humanos nos na Carolina do Norte - Estados Unidos, tendo no *A. americanum* seu provável vetor (APPERSON et al., 2008). No Brasil essa bactéria já foi detectada em carrapatos da espécies *A. cajennense* e *A. coelebs* na floresta amazônica brasileira e também em *A. longirostre* (LABRUNA et al., 2004).

No que se refere aos diferentes locais de coleta, 4 (2,7%), dos cães soropositivos eram provenientes de zona urbana e 57 (32,9%) da zona rural, verificando-se associação significativa ($p < 0,05$), onde animais da zona urbana tiveram um chance menor de se infectar (OR= 0,06) com *Rickettsia* sp. (Tabela 13).

TABELA 13- Freqüência de anticorpos anti –*Rickettsia* spp. em soro de cães na área urbana e rural da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Área	Animais de Chapadinha				Total	OR	IC	P
	Reagente		Não reagente					
	N	%	N	%				
Urbana	4	2,7	145	97,3	149	0,06	0,02	0.000001 ^a
Rural	57	32,9	116	67,1	173			

(^a) Qui- Quadrado (*) Associação significativa OR =Odds ratio

Em relação as três municípios estudados, verificou-se que em Anapurus os dois animais reagentes eram da zona urbana, em Mata Roma os 31 animais reagentes eram da zona rural e em Chapadinha 3 (6%), dos cães soropositivos eram provenientes de zona urbana e 25 (34, 25%) da zona rural, verificando-se associação significativa ($p < 0,05$), onde animais da zona urbana tiveram um risco menor de se infectar (OR= 0,06) (Tabela 14).

TABELA 14 - Freqüência de anticorpos anti –*Rickettsia* spp. em soro de cães na área urbana e rural no Município de Chapadinha no período de março de 2010

Área	Animais de Chapadinha				Total	OR	IC	P
	Reagente		Não reagente					
	N	%	N	%				
Urbana	3	6	47	94	50	0,12	0,03-0,47	0,00055 ^a
Rural	25	34,25	48	65,75	73			

(^a) Qui- Quadrado (*) Associação significativa OR =Odds ratio

Estes resultados concordam com Saito et al. (2008) que afirmam que os cães que têm contato direto com as áreas de pastagem ou floresta têm 2 vezes mais probabilidade de ser sororreativos para *Rickettsia* do que os cães sem contato direto.

Os resultados de Chapadinha associados com o de Mata Roma reforçam a hipótese de Labruna et al. (2007) ao afirmarem que cães da área rural tem uma maior prevalência de animais soropositivos para *Rickettsia* do GFM, possivelmente, ligada à maior diversidade de carrapatos que estes

cães são expostos, em contraste com o animais de zona urbana onde somente há contato com carrapato *R. sanguineus*.

Segundo relato dos proprietários, os seres humanos da região rural da microrregião de Chapadinha são comumente infestados por espécies de carrapatos que infestam os cães, observação esta também feita por Guglielmone et al. (2006) e Szabó et al. (2007) que registraram parasitismo por *A. ovale* em seres humanos e Guedes et al. (2005), Sangioni et al. (2005), Guglielmone et al. (2006) que afirmam que *A. cajennense* é muito agressivo aos humanos.

Dessa forma, os cães de fato servem como sentinelas para *Rickettsia* em humanos. Com base nesta assertiva e nos resultados do presente estudo, os seres humanos que vivem na região do leste maranhense são passíveis de serem infectados por pelo menos uma espécie de *Rickettsia*: *R. amblyommii*. Trabalhos para avaliar infecção humana por esses agentes no Maranhão são necessárias para verificar o papel potencial desta *Rickettsia* como possível patógeno para humanos.

Não foi observado associação ($p > 0,05$) entre a soropositividade para *Rickettsia* sp. e as variáveis raça e faixa etária (tabela 15), sugerindo que essas variáveis não constituem fatores de risco para a infecção, concordando com Saito et al. (2008) que também não encontraram associação entre essas variáveis.

Quanto ao sexo observa que houve associação significativa ($p < 0,05$) para fêmeas, apresentando frequência de 25%. Dessa forma, as fêmeas apresentaram maior risco (OR=2,0) de contrair a infecção quando comparados aos machos, fato este ainda não relatado na literatura.

Com relação à atividade de caça observou-se que animais que exerciam essa atividade tinham mais chance (OR= 2,33) de adquirir a infecção que animais que não eram caçadores. Esses resultados concordam com Saito et al. (2008) que também encontraram uma associação significativa entre animais soropositivos para *Rickettsia* e cães que são usados para pastoreio ou caça, indicando que o possível vetor da *Rickettsia* na região de estudo prefere viver em áreas rurais, sugerindo que esteja sendo mantida em um ciclo silvestre.

TABELA 15 - Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária, grupo racial e atividade de caça em cães soropositivos para *Rickettsia* spp. da microrregião de Chapadinha no período de março de 2010

Variável		Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P
		N	%	N	%				
Sexo	F	35	25	105	75	140	2	1,10-3,66	0,02209 ^{a*}
	M	26	14,3	156	85,7	182			
Raça	Definida	0	0	11	100	11			
	Indefinida	61	19,6	250	80,4	311			
Faixa etária	< 1 ano	19	22,1	67	77,9	86			
	1 - 3 anos	33	17,6	154	82,4	187			
	> 3 anos	9	18,4	40	81,6	49			
Atividade de caça	Caçador	25	29,4	60	70,6	85	2,33	1,24-4,35	0,00674 ^{a*}
	Não caçador	36	15,2	201	84,8	237			

(M) machos (F) fêmeas (^a) Qui- Quadrado (*) Associação significativa OR=Odds ratio IC= Intervalo de Confiança

5.6 Co-soropositividade e co-soronegatividade para *B. canis* e *E. canis*.

Dos 322 animais amostrados, 7 mostraram-se soropositivos para ambos os antígenos de *B. canis* e *E. canis*. Duzentos e trinta animais não foram reagentes para nenhum dos dois agentes (Tabela 16).

Dos 52 animais soropositivos para *B. canis*, 45 deles foram soronegativos para *E. canis*. Dos 47 cães soropositivos para *E. canis*, 40 animais não apresentaram anticorpos anti-*B. canis*.

Em cães, é muito comum a infecção concomitante por *E. canis* e *B. canis* (OLIVEIRA, 2004; DAGNONE, 2003; NAKAGHI et al., 2008). Esse fato é justificado pela presença do *R. sanguineus* que o carrapato vetor para ambos os hemoparasitas, e mesmo que os animais não estivesse parasitados no momento da coleta, não significa que não tenham tido contato em algum momento da vida com este vetor.

A coinfeção entre *E. canis* e *B. canis* no presente estudo foi baixa. Apesar da soroprevalência um pouco maior de *B. canis* em relação à de *E. canis*, esperava-se que essa diferença fosse maior, já que a presença de animais infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos pois não ocorre transmissão vertical nos artrópodes (NEER, 1998). *Babesia canis vogeli*, entretanto, pode ser transmitida por via transovariana e ser passada para a próxima geração de carrapatos na ausência de animais infectados (BOOZER & MACINTIRE, 2003).

TABELA 16 - Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de *E. canis* e *B. canis*.

	Animais sororeagentes a <i>E. canis</i>		Animais não sororeagentes a <i>E. canis</i>		Total
	N	%	N	%	
Animais sororeagentes a <i>B. canis</i>	7	13,5	45	86,5	52
Animais não-sororeagentes a <i>B. canis</i>	40	14,8	230	85,2	270
Total	47	14,6	275	85,4	322

5.7 Co-soropositividade e co-soronegatividade para *E. canis* e *Rickettsia* spp.

Dos 322 animais amostrados, 10 mostraram-se soropositivos para ambos os antígenos de *E. canis* e *Rickettsia* sp. 224 animais não foram reagentes para nenhum dos dois agentes.

Dos 47 animais soropositivos para *E. canis*, 37 deles foram soronegativos para *Rickettsia* sp. Dos 61 cães soropositivos para *Rickettsia* spp., 51 animais não apresentaram anticorpos anti- *E. canis* (Tabela 17).

Os resultados estão de acordo com os obtidos por Saito et al. (2008), no Rio Grande do Sul, que encontraram seis cães reagentes para *E.*

canis e *Rickettsia* sp., sugerindo que, como houve pouca reatividade cruzada entre *Ehrlichia* e *Rickettsia*, não se pode descartar a possibilidade de alguns soros reativos para *Enrlichia canis* ter sido resultado de reatividade cruzada com *Rickettsia*.

TABELA 17- Co-soropositividade e co-soronegatividade dos cães amostrados frente aos antígenos de *E. canis* e *Rickettsia* spp.

	Animais sororeagentes a <i>Rickettsia</i>		Animais não sororeagentes a <i>Rickettsia</i>		Total
	N	%	N	%	
Animais sororeagentes a <i>E. canis</i>	10	21,3	37	78,7	47
Animais não-sororeagentes a <i>E. canis</i>	51	18,5	224	81,5	275
Total	61	18,9	261	81,1	322

5.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

5.8.1 PCR para *B. canis vogeli*

Das 322 amostras analisadas pela PCR, três foram positivas para *B. canis*, com bandas visualizadas em 590 pares de base (pb). Destas, dois animais eram provenientes da zona urbana de Chapadinha e tinham resultados de RIFI negativos e o outro era proveniente de um animal da zona rural de Anapurus, o qual tinha RIFI positiva para *Babesia canis* (Figura 4).

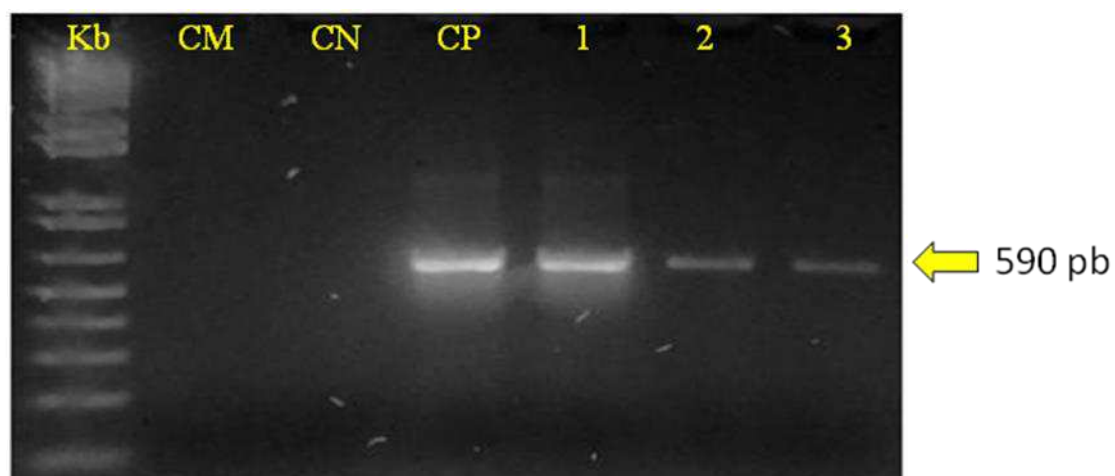


FIGURA 4 - PCR convencional, usando iniciadores BAB1/BAB4, específicos para *Babesia canis vogeli*. 1, 2 e 3 – Amostras positivas com amplificado de 590 pb.

B. canis vogeli é importante protozoário de cães transmitido por carrapatos. Esta espécie está distribuída em toda região tropical e subtropical, onde o vetor se faz presente. No Brasil, poucos estudos têm sido feitos no país e pouco se sabe sobre os aspectos epidemiológicos em cães de áreas rurais (PASSOS et al., 2005). Assim, esse trabalho avaliou a infecção de cães de áreas rurais e urbanas utilizando a técnica de PCR, e mostrou que apenas 0,93% dos animais foram positivos. Estes resultados levam-nos a inferir que os animais poderiam estar em período de parasitemia antes da soro-conversão e assim apresentaram PCR positivo e sorologia negativa; ou poderiam estar em fase crônica, e assim apresentaram PCR negativo e sorologia positiva, já que a sorologia não diferencia os animais verdadeiramente positivos, pois a pesquisa de anticorpos revela apenas se o animal já teve contato com o parasita; e ainda poderia haver parasitemia baixa, não detectada na PCR convencional, talvez somente detectada no isolamento ou PCR em tempo real, que são técnicas mais sensíveis.

Estudos no Brasil, utilizando métodos moleculares revelam percentual maior de animais positivos por essa técnica. O'Dwyer et al. (2009) relataram a presença de infecção por *Babesia* spp. em 8% dos cães de áreas rurais do Estado de São Paulo. Na região Nordeste, Ramos et al. (2010) em

Recife- Pernambuco, observaram positividade de 7,31% de animais por PCR para *B. canis vogeli* .

Quando comparamos com RIFI, observa-se que nesta 16,1% mostraram reatividade ao antígeno de *Babesia canis*, percentual maiores do que encontrados pela PCR. Isso provavelmente ocorreu porque no caso da PCR, sabe-se que os animais positivos realmente estão infectados pelo parasita, independente se em fase aguda da doença ou em estado de portador assintomático, Já a RIFI indica apenas uma exposição prévia do animal ao agente etiológico e que o parasito circula na região em estudo. Dessa forma, é de se esperar que os dados obtidos pela RIFI sejam superiores aos obtidos pela PCR.

Resultados da sorologia associados aos da biologia molecular e ao fato de os animais não apresentarem sintomatologia compatível com qualquer uma das doenças, levam à conclusão que os animais soropositivos tiveram contato prévio com os agentes, tendo conseguido recuperar- se da infecção.

A determinação das espécies, subespécies e genótipos dos agentes que causam a babesiose canina é importante, uma vez que a virulência, o prognóstico e a resposta ao tratamento são diferentes (BIRKENHEUER et al., 2003). Os dados mostram que no Maranhão, *Babesia canis vogeli* está presente na região, sendo necessários mais estudos, como análise de seqüência genética visando o esclarecimento a respeito das subespécies ou cepas que ocorre nessa região e de sua epidemiologia e otimização de estratégias de controle.

Devido à extensão territorial do estado e às diferenças epidemiológicas, estudos semelhantes devem ser conduzidos em outras áreas para que se possa ampliar os conhecimento sobre a infecção por *B. canis* em cães do estado do Maranhão.

5.8.2 PCR de sangue para *Rickettsia* spp.

Das 322 amostras analisadas pela PCR, nenhuma foi positiva para o gene citrato sintase (gltA) .

Tomassone et al. (2010) analisando amostras de sangue de 44 animais, verificaram que um animal era positivo para o gene citrato sintase (gltA), mas sendo negativo para o PCR ompA e ompB, sendo este cão positivo na sorologia para *R. parkeri*. Segundo Horta et al. (2007) a detecção de DNA de *Rickettsia* em sangue de hospedeiro vertebrado é considerado um evento raro, além disso a concentração do agente no sangue é baixo (LA SCOLA & RAOULT, 1997). Desta forma, justificando a falta de resultados positivos no PCR das amostras de sangue dos animais analisados para o gene citrato sintase (gltA) tendo a necessidade de técnicas mais sensíveis e específicas para a detecção da bactéria, assim como o gene utilizado e a fase de rickettsemia.

5.8.3 PCR dos carrapatos para *Rickettsia* spp.

No total, foram processados 253 carrapatos para pesquisa dos gene gltA e dessas apenas uma amostra de *A. ovale* foi positiva, sendo testada para o gene ompA, onde também revelou positividade. Todos os fragmentos amplificados tiveram as duas fitas do DNA seqüenciadas que apresentaram similaridade com as seqüências de nucleotídeos de *Rickettsia bellii* (GenBank U59716).

Diversos estudos no Brasil, com várias espécies de carrapatos têm resultado no isolamento ou caracterização de espécies patogênicas de *Rickettsia*: *A. cajennense* infectado com *R. felis* (SANGIONI et al., 2005) e com *R. rickettsii* (GUEDES et al., 2005), *A. triste* infectado com *R. parkeri* (SILVEIRA et al., 2007), *A. aureolatum* infectado com *R. rickettsii* (PINTER & LABRUNA, 2006), *R. sanguineus* infectado com *R. felis* (OLIVEIRA et al., 2008) e com *R. rickettsii* (MORAES-FILHO et al., 2009).

Além disso, *Rickettsia bellii*, uma espécie classificadas fora do GFM, tem sido relatado infectando inúmeras espécies de carrapatos pertencentes aos gêneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* no norte e no sudeste Brasil.(PINTER & LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2007; HORTA et al., 2007).

Estrada et al. (2006) encontraram em carrapatos de um parque urbano, no município de São Paulo, seqüências de nucleotídeos do fragmento do gene *gltA*, gênero-específico similaridade com *R. bellii* (GenBank U59716). Sugerindo que esta espécie esteja amplamente distribuída no Brasil. *R. belli* também já foi encontrada em *A. cooperi* capturados no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2004a).

Labruna et al. (2004a) afirmam que *R. bellii* é a espécie de *Rickettsia* mais comum infectando carrapatos em Rondônia, sendo encontrada em *A. ovale*, *A. sculpturatum* e *A. oblongoguttatum*. Os autores afirmam que estas espécies de carrapatos são as que mais se alimentam em seres humanos neste estado, supondo que o potencial de exposição dos humanos às *Rickettsias* patogênicas conhecidas na América do Sul pode ser minimizado pela alta taxa de infecção com *R. bellii*, já que existem estudos que mostram que a presença de uma espécie *Rickettsia* dentro de uma população de carrapatos pode minimizar ou até mesmo inibir a transmissão de uma segunda espécie *Rickettsia*. Dessa forma, não se pode descartar que a população de carrapatos deste estudo possam estar infectada a uma taxa baixa por outra espécie de *Rickettsia* que não a *R. bellii*.

Até o momento, esta bactéria, por ainda não ter sido encontrada em humanos, tem sido considerada não patogênica. Tem a peculiaridade de não se classificar dentro do GFM ou GT; é tida como provável ancestral das riquetsias pertencentes dos dois grupos clássicos.

Sugere-se que novos estudos, devam ser realizados na região Leste do Maranhão, abrangendo também carrapatos na fase não parasitária, a fim de se constatar a real presença de vetores infectados com espécies de *Rickettsia* no Estado.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- Os cães da microrregião de Chapadinha apresentaram parasitismo por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma ovale*.
- Cães residentes em áreas urbana e rural da microrregião de Chapadinha- MA estão expostos a infecção natural por agentes da babesiose canina, erliquiose canina e rickettsioses.
- Houve co-infecção entre *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* sp. e *Ehrlichia canis*, porém não houve co-infecção entre os três agentes.
- Grupo racial e área urbana foram associadas à infecção por *Babesia canis*.
- As variáveis sexo, atividade de caça e área rural foram associadas à infecção em *Rickettsia*.
- A PCR permitiu amplificar o DNA de *Babesia canis vogeli* no sangue.
- O sequenciamento do fragmento da PCR amplificado, baseada no gene OmpA confirmou pela primeira vez a detecção de *Rickettsia bellii* em carrapatos obtidos de cães da microrregião de Chapadinha- MA.

REFERÊNCIAS

ABEL, I.; PEDROZO, M. G. C.; BUENO, C. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em cães domésticos procedentes da Reserva Florestal do Boqueirão, município de Ingaí, sul de Minas Gerais. **Arq Inst Biol**, v. 73, n. 1, p. 111-112, 2006.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciênc Rural**, v.37, n.3, p.796-802, mai-jun, 2007

AGUIRRE, E. ; SAINZA, A.; DUNNER, S.; AMUSATEGUIA, I.; LÓPEZ, L., RODRIGUÉZ-FRANCO, F.; LUACES, I.; CORTÉS, O.; TESOURO, M. A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Vet Parasitol**, v. 125, p. 365–372, 2004.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: a revisão. **Clín Vet.**, v. 4, p. 31-38, 1999.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII Lista e chave para os representantes da fauna ixodologica brasileira. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.

APPERSON, C. S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W. L.; MEAD, D. G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M. J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D. W. Tick borne diseases in North Carolina: is “*Rickettsia amblyommii*” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 8, n. 5, p. 597–606, 2008.

BASHIRUDDIN, J. B., C. GAMMA, E. REBELO. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Vet Parasitol**, v. 84, p.75–83, 1999.

BERMÚDEZ, S.E.; EREMEEVA, M. E.; KARPATY S.E., SAMUDIO, F. ZAMBRANO, M.L.; ZALDIVAR, Y.; MOTTA, J. A.; DASCH, G. A. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. **J Med Entomol**, v.46, n.4, p.856-61, 2009.

BICALHO, K.A., RIBEIRO, M.F., MARTINS-FILHO, O.A. Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotozoan *Babesia canis* infection in dogs. **Vet Parasitol**, v. 125, p.221–235, 2004.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 4172-4177, 2003.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Vet Clin Small Anim**, v. 33, n.4, p. 885-904, 2003.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDORFER, W.; CORBETT, W. T.; HURLBERT, S. A. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **Am J Vet Res**.v.6, p. 49-70, 1987.

BROUQUI, P. F.; BACELAR, F.; BARATON, G. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v.10, p.1108-1132, 2004.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D.H. **Biol of Rickettsial Dis**, v. 1, p. 33-50, 1988.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.B.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R. C.; Walker, D.H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **Bras J Infect Dis**, v. 8, n. 3, p. 259-262. 2004.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. Circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CARRET, C; WALLAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E., MOUBRI, K.;SCHETTTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Length Polymorphism Analysis on Amplified Small

Subunit Ribosomal RNA genes. **J Euk Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE G.R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genet Mol Res**, v. 7, p. 657-662, 2008.

CARLOS, R. S.; MUNIZ NETA, E. S.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L.; DE BRITO, R. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus- Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Rev. Bras Parasitol Vet**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**. v.15, n.532, p.7, 1993.

COSTA, J. O.; BATISTA JÚNIOR, J. A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, P.M. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Esc de Vet da Univer Fed Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA, P. S. G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. More About Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. **Braz J Infect Dis**, v.10, n.1, p. 7-10. 2006.

COSTA-JÚNIOR, L. M. C; RIBEIRO, M.F.B.; REMBECK, K.; RABELO, E.M.L; ZAHALER-RINDLER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F.. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

COSTA-JÚNIOR, L.M.; RIBEIRO, M.F.B.; REMBECK, K.; RABELO, E.M.L; ZAHALER-RINDLER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Res Vet Sci**, v 86, p. 257–260, 2009.

CUNHA, N. C; FONSECA, A.H; REZENDE, J.; ROZENTAL, T; FAVACHO, A. R.M. ; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C L.; LEMOS, E. R.S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesq Vet Bras**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

CUPP, E. W. Biology of ticks. **Vet Clin N Am Small Anim Pract**, Philadelphia, v.21, n. 1, p. 1-25, 1991.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Sem Cienc Agrar**, v.2, p. 191-209, 2001.

DAGNONE, A.; MORAIS, H.; VIDOTTO, M.; JOJIMA, F.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet Parasitol**, v. 117, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L.A., FAUSTINO, M.A.G.. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 13, p. 151–154, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; L. A. FIGUEREDO. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Vet Parasitol**, v. 141, p.197-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F., The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Vet Parasitol**, v.152 , p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Syst and Applied Acarol**, v. 14, p. 30-46, 2009.

DEMMA, L. J., M. S. TRAEGER, W. L. NICHOLSON, C. D. PADDOCK, D. M. BLAU, M. E. EREMEEVA, G. A. DASCH, M. L. LEVIN, J. SINGLETON, S. R. ZAKI, J. E. CHEEK, D. L. SWERDLOW, AND J. H. MCQUISTON: Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New Engl J Med**, v.353, p. 587–594. 2005.

DEL FIOL, F.S; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A. febre maculosa no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v.27, n. 6, p.461–6, 2010.

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs of the city of São Paulo. Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescent antibody test. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.

DINIZ, P.P.; SCHWARTZ, D. S.; MORAIS, H. S.; BREITSCHWERDT, E. B. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 4, p. 689- 697, 2007.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BECKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.51, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER J.S.; MADIGAN J. E.; PUSTERIA, N. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis**. v.45, p.45–51, 2007.

ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.;LINHARES, A. X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, p. 68-71, 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Exp Appl Acarol**, v. 23, p. 685-715, 1999.

EVANS, D.E.; MARTINS JR.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 453-70, 2000.

FARWELL, G.E.; LEGRAND, E. K.; COBB, C. C. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 180, n. 5, p. 507-511, 1982.

FREITAS, M. C. D. O.; GRYCAJUK, M.; MOLENTO, M.B.; BONANCI, J.; LABRUNA, M.B.; MORAES-FILHOS, J.; PACHECO, R. C.; DECONTO, I.; BIONDO, A. W. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 2, p. 130-131, abr.-jun. 2010.

FÖLDEVÁRI, G.; HELL, É.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Vet Parasitol**, v.127,p. 221–226, 2005.

FURUTA, P.I.; OLIVEIRA, T. M. F. S; TEIXEIRA, M. C. A.; ROCHA, A. G.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18, n. 3, p. 41-45, jul.-set. 2009.

GALVÃO, M. A. M.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B. CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E. A.; LEITE, R. C.; CARAM, C.; MAFRA, C. L. WALKER, D. H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro,v. 18, n.6, p.1593-1597, nov-dez, 2002.

GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; MORON, C.; ANAYA, E.; WALKER, D. H. Rickettsiosis of Genus *Rickettsia* in South America. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 990, p. 57-61, 2003.

GASSER, R.B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Vet Parasitol**, v. 136, p. 69–89, 2006.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.841, p. 5, 2005.

GUIMARÃES, A. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; SANTA ROSA, I. C. A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clín Vet**, ano 8, n. 41, p. 60-68, 2002.

GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em

nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18, supl. 1, p. 49-53, 2009.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A., Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROSBATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Eds.). **Carrapatos de importância médico-veterinária na Região Neotropical**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, cap. 7, p. 115-124, 2006.

GURGEL, C.B.F.M.; COUTINHO, E.R.; FAVORITTO, P.C.; RAMOS, F.; PROQUERE, L.P.; MAGDALENAS, C.V.; PRIOLI, L.F. Investigações das riquetsioses: contribuições de cientistas brasileiros. **Rev Bras Clin Med**, v.7, p. 256-260, 2009.

GUEDES E, LEITE RC, PRATA MC, PACHECO RC, WALKER DH, LABRUNA MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 841-845, 2005.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. **J Ven An Tox incl Trop Dis**, v. 14, n. 1, p. 3-18, 2008.

GUERRA, R. M. S. N. C.; BRITO, D. R. B. Ixodofauna de mamíferos domésticos da Ilha de São Luís, estado do Maranhão, Brasil. **Entom y Vect**, v. 11, n. 3, p. 435-444, 2004.

HARRUS, S.; AROCH, I; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet Rec**,v. 141,p. 247–250, 1997;

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a brazilian spotted fever-endemic área in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. **Am J Trop Med Hyg**, Northbroock, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission, and transestadial survival of *Rickettsia bellii*

in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p.285-90, 2006.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, p. 793–801, 2007.

HUXSOLL, D. L. Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): a review. **Vet Parasitol**, v.2,p. 49- 60, 1976.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), **Censo demográfico**, 2010.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura). **Técnicas para El diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas**. San José, p.79, 1987.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; BROUQUI, P. Epidemiological Survey of *Ehrlichia canis* and Related Species Infection in Dogs in Eastern Sudan. **Ann NY Acad Sci**, v.1078, n. 1, p. 461–463. 2006.

IQBAL, Z; CHAICHANASIRIWITHAYA, W; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J Clin Microbiol**, v.32, n.7, p. 1658-1662, 1994.

IQBAL, Z.;RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J Clin Microbiol**, v.32, p. 1658-1662, 1994

IRWIN PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasit Vectors**, v.2, p.1–9, 2009.

IRWIN, P. J. Canine Babesiosis. **Vet Clin Small Anim**, v.40, p. 1141–1156, 2010.

KJEMTRUP, A. M.; CONRAD, P.A. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasms isolates in the western United States inferred from the 18S

nuclear small subunit RNA gene. **Parasitology**, Cambridge, v.120, n. 5, p. 487-493, 2000.

KRAUSE, P. J.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 11, p. 2791-2794, 1996.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKIN, J.. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Vet Therapeutics**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LABRUNA, M.B., HOMEM, V.S.F., HEINEMANN, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, Eastern Amazon-Brazil. **J Med Entomol**, v.37, p.774-776, 2000.

LABRUNA, M.B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES JR, J.S.; PACHECO, R.C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arq Bras Med Vet. Zootec**, v.53, n.5, p.553-556, 2001.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clín Vet.**, v. 30, p. 24-31, 2001.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brasil. **Vet Parasitol**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J.;PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J Clin Microbiol**, v. 42, n.1, p.90-98, 2004.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **J Med Entomol**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004a

LABRUNA, M.B.; JORGE, R.S.P.; SANA, D.A.; JACOMO, A.T.A.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; FERRO, C.; PEREZ, S.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T.S. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 36, p. 149-163, 2005.

LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from the *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann NY Acad Sci**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

LAKSHMANAN, B.; JOHN, L.; GOMATHINAYAGAM, S.; DHINAKARRAJ, G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* from blood of naturally infected dogs in India. **Veterinarski Archiv**, v. 77, n.4, p. 307-312, 2007.

LA SCOLA, B; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. **J Clin Microbiol**, v.35, p.:2715-2727, 1997.

LEMOS, E. R; MACHADO, R. D.; COURA, JR. Rocky Mountain spotted fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.89, p.497-501, 1994.

LEMOS, E.R.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. et al. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v.38, p.427-430, 1996.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infected ticks in a endemic area of

spotted fever em the Estate of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 477-481, July/Ago. 1997.

LEMOS E.R.; ROZENTAL, T.; VILLELA, C. L. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, n. 5, p.523-25, 2002.

LOPES, V.V.A.; RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Estudo parasitológico e molecular da infecção por *Babesia* spp. em cães de áreas rurais do estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006. Ribeirão Preto, MG. **Anais...**Ribeirão Preto, p. 340. 2006.

MAIA, M.G.; COSTA, R.T.; HADDAD, J.P.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. **Prev Vet Med**, 79, 155–162, 2007.

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA ADE, M.; FREIRE, I.M., LINHARES, G.F.; ALMEIDA N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Clin Pathol**, v.34,p. 44–48, 2005.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M.B.; DAGNONE, A. S.; SZABÓ, M. P. J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Vet Parasitol**, v. 139, p.262–266, 2006.

MAGNARELLI, L. A; ANDERSON, J. F.; PHILIP, R. N; BURGDORFER, W.; CASPER, E. A. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. **Am J Trop Med Hyg**;v. 30, n.239,p.52, 1981.

MARTINS, T. F.; SPOLIDORIO, M. G.; BATISTA, T. C. A.; OLIVEIRA, I. A. S.; YOSHINARI, N. H.; LABRUNA, M. B. Ocorrência de carrapatos (Acari: Ixodidae) no município de Goiatins, Tocantins. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18, n. 2, p. 50-52, abr.-jun. 2009.

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

MATHEWS, J. S.; EWING, S. A.; MALAYER, J. R.; FOX, J. C.; KOCAN, K. M. Efficacy of a modified chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection. **J Vet Diagn Invest**, v. 12, p. 456- 459. 2000.

McBRIDE, J. W ;CORSTVET, R. E. ; BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 315-322, 2001.

MIRANDA, F. J. B.; ALBERNAZ, A. P.; MELO JR, O.A; MACHADO, J. A. Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ. **Ciência Animal Bras**, v. 9, n. 1, p. 238-241, 2008.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 1, p. 73- 78, 2009.

NAKAGHII, A. C. H; MACHADO, R. Z.; COSTAI, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, mai-jun, 2008.

NAKAGHI, A. C. H; MACHADO, R. Z.; FERRO, J. A.;LABRUNA, M. B.; CHRYSSEAFIDIS, A.L. ;ANDRÉ, M.R. BALDANI, C.D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* *p28* gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 75-79, abr.-jun. 2010.

NEER, T. M. Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: Greene, C.E. (Ed.), **Infectious Disease of the Dog and Cat**. WB Saunders, Philadelphia, p. 139–147. 1998.

O`DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; PINTO, E.D.S. Desenvolvimento de *Babesia canis* (Piana e Gallivalerio, 1985) nos ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Med Vet**, v. 19, n. 2, p. 58-61, 1997.

O`DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

O'DWYER, L. H.; LOPES, V. V. A.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil, **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 18, n. 2, p. 23-26, abr.-jun. 2009

ONOFRIO, V. C.; LABRUNA M.B.; BARROS-BATTESTI, D.M.. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Ixodes*. In: Darci Moraes Barros-Battesti; Márcia Arzua; Gervásio Henrique Bechara. (Org.). **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1 ed. São Paulo: VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, v. 5, p. 41-51. 2006.

OLIVEIRA, P. R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto, MG. **Rev Bras Parasitol Vet** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 118 . 122, 2004.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E. et al. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (Acari:Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Vet Parasitol**, v. 129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.17, n. 1, p.7-11, 2008.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURA, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R. CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clin Microbiol and Infect**, v. 15, Supl. 2, p. 55-56, 2009.

ORIÁ, A. P.; FRANCISCO, P.; MACHADO, R. Z. ; SANTANA, Á. E.; GUERRA, J. L.; SILVA, V. L. D.; BEDFORD, P.R G C; LAUS, J. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Rev Bras Cien Vet**, v. 15, n. 2, p. 94-97, 2008.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 4, p. 157-163, 2009.

OTOMURA, F. H.; SANGIONI, L. A.; PACHECO, R. C. LABRUNA, M.B.; GALHARDO, J.A.; RIBEIRO, M.G.; TEODORO, U. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.3, p.761-764, 2010

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. A.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, p. 364-371, 2007.

PACHECO, R.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B. isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brazil. **Rev M V Z Córdoba**, v. 13, n. 2, p.1273-1279, 2008.

PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; KOSS, T.; SINGLETON, J. JR.; SUMNER, J.W.; COMER, J. A.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; CHERRY, B.; CHILDS, J. E. Rickettsialpox in New York City: a persistent urban zoonosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.990, p.36-44, 2003.

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PADDOCK, C. D., S.; FERNANDEZ, G. A. ; ECHENIQUE, J. W.; SUMMER, W. K.; REEVES, S. R.; ZAKI, C. E.; REMONDEGUI. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **Am J Trop Med Hyg**, v.78, p. 687-692, 2008.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clin Infec Dis**, v.32, p.897–928. 2001.

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZÄHLER-RINDER., M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol**, v. 127, p. 81-85, 2005.

PEDROSA, L.A.C. Monocultura e direitos humanos. **Eco & Ação: Ecologia e responsabilidade**, 2007. Disponível em < <http://www.ecoeacao.com.br>> Acesso em setembro, 2009.

PEGRAM, R. G.; KEIRANS, J. E.; CLIFFORD, C. M. et al. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari. Ixodidae). II. *R. sanguineus* (LATREILLE, 1806) and related species. **Syst. Parasitol.**, v. 10, n. 1, p. 27-44, 1987.

PELEG, O.; BANETH, G.; EYAL, O.; INBAR, J. HARRUS, S. Multiplex real-time qPCR for the detection of Ehrlichia canis and Babesia canis vogeli, **Vet Parasitol** , v.173 p. 292–299, 2010

PEREIRA, M.C; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínico epidemiológicos. **Clín Vet**, ano 2, n. 12, p. 19-23, jan./fev. 1998.

PEREZ, M., RIKIHISA, Y., WEN, B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J Clin Microbiol** v.34, p. 2133–2139, 1996.

PEREZ,C.A; ALEMEIDA,A.F.;ALMEIDA,A.; CARVALHO, V.H.B.;BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; SANTOS, A.D.A., ESPÍNDOLA, C.P.M.; BATTESTI, D.M.B. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (acari: ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 4, p.210-217, 2008.

PINTER A, HORTA MC, PACHECO RC, MORAES-FILHO J, LABRUNA MB. Serosurvey of Rickettsia spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian potted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica**, v.24, n. 2, p. 247-52. 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann NY Acad Sci**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PINTER , A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro,v. 24, n.2, p.247-252, fev, 2008.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J.; Serologic typing of Rickettsiae of the Spotted Fever Group by microimmunofluorescence. **J Immunol.**, v. 121, n. 5, p. 1961-1968, 1978.

QUEIROGAS, V.L.; MARTINS-OLIVEIRA, L.; LEAL-MARQUES, R.; OLIVEIRA, D.S.F.; SZABÓ, M.P.J. Ticks (Acari: Ixodidae) on domestic dogs in Serra de Caldas Novas State Park, Goiás: epidemiological aspects. **Biota Neotrop.**v.10, n. 1, p. 347-349, 2010.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RAOULT, D.; PAROLA, P. Rickettsial Diseases. **New York London**, 2007.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitol Res**, v 107, p. 1115–1120, 2010.

REGNERY R. L; SPRUILL C.L; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J Bacteriol**, v.173, p. 1576-1589, 1991.

RENVOISÉ, A., MEDIANNIKOV, O., RAOULT, D. Old and new tick-borne rickettsioses. **Inter Health**, v.1, p. 17-2, 2009.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. Frequência de anticorpos fluorescentes anti-Babesia canis em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v. 42, p. 511-517, 1990.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. **Clin Microbiol Rev**, v.4, n.3., p.286-308, 1991.

RODRIGUES, D.F.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A.F.S.F. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz

de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 4, p.185-188, 2008.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. S. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 155-158, 2002.

RISTIC, M. et al. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infect Immun**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1972.

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

SÁ, A. G.; CERQUEIRA, A. M. F.; O'DWYER, L. H.; MACIEIRA, B. M.; ABREU, F. S.; FERREIRA, F. R.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected brazilian dogs. **Intern J Appl Res Vet Med**, v. 4, n. 2, 2006.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N. A. R.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SAINZ, A.; DELGADO, S.; AMUSATEGUI, I., TESOURO, M., CARMENES, P., Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leo'n (north-west Spain). **Prev Vet Med**, v.29,p. 1-7. 1996.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.B.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, M.A.M.; SCHUMAKER, T.T.S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infections in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerg Infect Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SCORPIO, D. G.; WACHTMAN, L. M.; TUNIN, R. S.; BARAT, N. C.; GARYU, J. W.; DUMLER, J. S. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. **Am Assoc Labor An Sci**, v. 47, n. 5, p. 23-28, 2008.

SERRA-FREIRE, N. M. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 3, p. 141-147, jul.-set. 2010.

SHIMADA, Y.; BEPPU, T.; INOKUMA, H.; OKUDA, M.; ONISHI, T. Ixodid tick species recovered from domestic dogs in Japan. **Med Vet Entomol**, v. 17, n. 1, p. 38-45, 2003.

SILVA, M.M., SANTOS, A.S., FORMOSINHO, P.; BACELLAR, F. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. **Acta Med Port**, v. 19, p. 39-48, 2006.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. BOA; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet.**, Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 108-111, abr.-jun. 2010.

SILVA, M. E.; RIBEIRO, R. R.; COSTA, J. O.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C., LABRUNA, M.B. Prevalência de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.4, p.1007-1010, 2010.

SILVA, M. H. S.; SILVA, J. A.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, M. X.; MENESES, J. N. C.; MOREIRA, E. C. Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.4, p.1002-1006, 2010.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R.M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R.S.; KO, A. I. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 17, n. 2, 2011.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M.B. Rickettsia parkeri in Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-1113, 2007.

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; RODRIGUEZ NETO, E. J.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, 2006.

SOUZA, B. M. P.S.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C. P. M.; UZÊDA, R. S.; ALCÂNTARA, A. C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; GONDIM, L. F. P.; FRANKE, C. R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet.**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 89-93, abr.-jun. 2010.

STICH, R. W. ; SCHAEFER, J. J. , BREMER , W. G.; NEEDHAM, G. R. ; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Vet Parasitol**, v. 158, n. 4, p. 256-273, 2008.

STROMDAHL, EY, VINCE, MA, BILLINGSLEY, PM, DOBBS, NA, WILLIAMSON, PC. Rickettsia amblyommii infecting Amblyomma americanum larvae. **Vector Borne Zoonot Dis**; v. 8, p. 15–24, 2008.

SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J. ; BREITSCHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol**, v.17, n.2, p. 74-8, 2001

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M. PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil, **Exp Appl Acarol**, v. 25, p. 909–916, 2001.

SZABÓ, M.P.; MANGOLD, A.J.; JOÃO, C.F.; BECHARA, G.H.; GUGLIELMONE, A.A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet Parasitol**, v.130,p. 131–140, 2005.

SZABÓ, M.P.J.; OLEGÁRIO, M.M.M.; SANTOS, A.L.Q.. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Exp Appl Acarol**, v. 43, n. 1, p.73-84, 2007.

SZABÓ, M.P.; CASTRO, M. B.; RAMOS, H. G.; GARCIA, M. V.; CASTAGNOLLI, K. C.; PINTER, A. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Vet Parasitol**, v.143, p.147–54, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A; OLEGÁRIO, M. M. M; FERREIRA, F. A; PAJUABA NETO, ALBUQUERQUE, Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Trans Emerg Dis**, v. 57, p. 72–74, 2010.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. *Veterinary. Clin of North Am Small An Pract*, v. 21, n. 1, p. 47-50, January 1991.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet Parasitol*, Amsterdam, v. 140, p. 223-230, 2006.

TOMASSONE, L; CONTE, V; PARRILLA, G; DE MENEGHI, D. Rickettsia Infection in Dogs and Rickettsia parkeri in Amblyomma tigrinum Ticks, Cochabamba Department, Bolivia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v. 10, p.10, 2010.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães, atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UILENBERG, G., F. F.; FRANSSSEN, N. M.; PERIE, A. A. SPANJER. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q*, v.11, p.33-40, 1989.

UNGAR DE SÁ, M. F. M.; UNGAR DE SÁ, J. E.; BITTENCOURT, D. V. V; BISPO, A.C.; RÉGIS, A. M. M.; SOUZA FILHO, N. J.; GOMES NETO, C. M. B.; SOUZA, B. M.P. S.; BITTENCOURT, T. C. C.; FRANKE, C. R. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. *Rev Bras Saúd e Prod An*, v. 8, n. 3, p. 178-183, 2007.

UNVER, A.; PEREZ, M.; OREELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *J Clin Microb*, v.39, n.8, p. 2788-2793, 2001.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12, jan.-mar. 2011.

WAGNER, G.; CRUZ, D.; HOLMAN, P.; WAGHELA, S.; PERRONE, J.; SHOMPOLE, S.; RURANGIRWA, F. NON-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 87, Suppl 3, p.193-9, 1992.

WALKER, D.H.; PADDOCK, C.D.; DUMLER, J.S. Emerging and re-emerging tick-transmitted Rickettsial and Ehrlichial infections. **Med Clin N Am**, v. 92, p. 1345–1361, 2008.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of Nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J Clin Microbiol**, v. 35, n.7, p. 1852-1855, 1997.

WIKSWO, M .E.; HU, R.; METZGER, M. E.; EREMEEVA, M. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from **California**. **J Med Entomol**, v. 44, n. 1, p. 158-62, 2007.

WILLIAMS, E.S.; YUILL, T.; ARTOIS, M.; FISHER, J.; HAIGH, S.A. Emerging infectious disease in wildlife. **Rev Sci Tech OIE**, v.21, p.139-157, 2002.

YAMANE, I. J. W., THOMFORD, J.W.; GARDNER, I. A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Am J Vet Res**, v.54, p.1579-1584, 1993.

YAMANE, I., J. W.; THOMFORD, I. A; GARDNER, J. P. ; DUBEY, M. ; LEVY, P. A.; CONRAD. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California. **Prevent. Vet. Med**,v. 18, p. 293–304, 1994.

ZAHLER, M., E.; SCHEIN, H.; RINDER,I; GOTHE. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol. Res**, v. 84, p. 544–548, 1998.

ANEXO

FICHA N°

DATA

QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO

Este questionário pretende conhecer alguns aspectos das condições de criação de cães nos municípios de Chapadinha, Mata Roma e Anapurus. Os dados obtidos serão usados em trabalhos científicos dos grupos de pesquisas Morfobiologia e Patogenia de Parasitos de Animais, Imunopatologia e Morfofisiologia e Patogenia de Artrópodes Ápteros, e na Universidade Estadual do Maranhão e da Fundação Oswaldo Cruz.

MUNICÍPIO:.....

Zona rural () Zona Urbana ()

1-Identificação do Proprietário

Nome:.....Telefone.....

Endereço:

Rua.....Bairro:.....Cidade:.....

Tipo de residência: () Casa () Apartamento ()

Outros:.....

2-Identificação do Animal

Nome:.....Raça:.....

Sexo: () Macho () Fêmea Idade: () ≥1ano () <1ano Pelagem: ()
curta () longa

3- Aspectos Sanitários

Seu animal é vacinado? () sim, viroses () sim, viroses e raiva () Apenas a
de raiva () outras () não

Presença de ectoparasita () sim () não

Qual (is)? () Pulga () Carrapato () Piolho () outros

Seu animal já teve carrapatos? () Sim () Não () Não sei

Ele foi tratado? () Sim () Não

O que foi utilizada para acabar com os carrapatos? () Banhos com

Carrapaticidas () Sabão comum associado a extração manual ou com pinça

() Banhos com remédios caseiros Qual ?

4- Habitat

O cão tem contato com a mãe? () Não () Sim

O animal tem acesso à rua? () Não () Sim

O animal é de caça? () Não () Sim

Se positivo, com qual frequência? () Diário () Semanal () Esporádico

O cão tem contato com espécies silvestres (em fazendas, sítios, etc.)? () Não
() Sim

Se positivo, quais

animais?.....

Onde o cão passa a maior parte do tempo? () Rua () Quintal () Interior da
residência

O cão tem contato com roedores? () Não () Sim

O cão tem contato com gatos? () Não () Sim

Possui outros animais em casa? () Não () Sim

Se positivo, quais? () Cães () Gatos () Aves () Outros

Proximidade de mata? () sim () não

5- Parâmetros Clínicos

Estado Geral do Animal: () bom () ruim () caquético

Conjuntivas () normal () ictérica () pálida () hiperêmica () cianótica

Mucosa Oral () normal () ictérica () pálida () hiperêmica () cianótica

Apresentou doenças reprodutivas? () Não () Sim

Apresenta ou apresentou manifestações neurológicas? () Não () Sim

Petéquias () Equimoses () Epixtasia ()

Observações: