



## Diagnóstico molecular para Hemoparasitos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil

Edilson Isídio da Silva Junior<sup>1</sup>, Adriana Cortez<sup>1</sup>, Renata Bottura<sup>1</sup>, Simone Gonçalves Rodrigues Gomes<sup>2</sup>, Rafael Garabet Agopian<sup>1</sup>, Jonas Moraes-Filho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Medicina Veterinária e Doutorado com ênfase em Saúde Única, Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brazil. <sup>2</sup>Hemovet, Laboratório e Centro de Hemoterapia Veterinária, São Paulo, SP, Brazil.

### RESUMO

#### OBJETIVO

Deteção de *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma platys*, *Rangelia vitallii*, *Babesia canis vogeli* por meio de PCR em tempo real em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Santo Amaro, localizado na zona sul, do município de São Paulo, SP, Brasil.

#### MÉTODOS

Foi realizada extração de DNA de 63 amostras de sangue total pelo “kit” de extração “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen®) conforme instruções do fabricante e realizada a PCR em tempo real para a deteção de *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma platys*, *Rangelia vitallii*, *Babesia canis vogeli*.

#### RESULTADOS

23,8% (15/63) das amostras foram positivas na PCR em tempo real para pelo menos um agente patogênico. Destas, 9,52% (6/63) foram positivas para *Babesia canis vogeli* e 14,2% (9/63) para *Ehrlichia canis*. Nenhuma amostra foi positiva para *Rickettsia rickettsii*, *Rangelia vitalli* e *Anaplasma platys*.

#### CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a presença de *B. canis vogeli* e *E. canis* em cães de áreas de fragmentação de Mata Atlântica aos arredores da represa Guarapiranga da cidade de São Paulo de maneira inédita, ampliando o conhecimento da dispersão desse agente no país.

#### DESCRITORES

*Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli*, *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma platys*.

#### Corresponding author:

Jonas Moraes-Filho. Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal e Doutorado em Medicina Veterinária em Saúde Única, Universidade Santo Amaro (UNISA). Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 – Jardim das Imbuías, São Paulo, Brazil, E-mail: [jmfilho@prof.unisa.br](mailto:jmfilho@prof.unisa.br); ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4734-9512>

**Copyright:** This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

## INTRODUÇÃO

Os artrópodes e suas hemoparasitoses associadas<sup>1</sup> têm se expandido por diferentes regiões do mundo, devido às mudanças climáticas e o acesso desses parasitas à novos habitats ambientais<sup>2</sup>. Desta forma, o diagnóstico molecular destes agentes patogênicos relacionados com a área geográfica estudada fornece dados epidemiológicos importantes para profilaxia, controle e tratamento das enfermidades<sup>2</sup>.

Entre as manifestações clínicas que os cães acometidos podem apresentar, destacam-se hipertermia, perda de peso, letargia/apatia, palidez de mucosas, linfadenopatias, hemorragias difusas, hematuria, icterícia, petéquias, podendo progredir ao óbito<sup>3,4</sup>. As alterações laboratoriais mais comuns são trombocitopenia, anemia hemolítica, leucocitose ou leucopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hemoglobinúria e proteinúria<sup>3,4</sup>.

Entre os agentes que causam hemoparasitose canina estão a *Anaplasma platys*, *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis*, *Rangelia vitalii* e *Rickettsia* spp.

A espécie *Anaplasma platys* pertence à Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae* e Gênero *Anaplasma*<sup>5</sup>. São bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias de plaquetas, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de um quadro clínico denominado trombocitopenia cíclica canina<sup>6</sup>. O vetor do *A. platys* permanece incerto, porém existem diversas ocorrências de coinfeções com *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, sugerindo o envolvimento do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l.<sup>7,8,9</sup>.

A Babesiose canina brasileira é uma doença que possui como vetores os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l., sendo causada por hematozoários que parasitam, preferencialmente, eritrócitos jovens<sup>10</sup>. As espécies *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* são os agentes etiológicos da doença<sup>11,12</sup>. São conhecidas três subespécies de *B. canis*: *B. canis* transmitida pelo *Dermacentor reticulatus* na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* s.l. em regiões tropicais e subtropicais e *B. canis rossii*, transmitida pelo *Haemophysalis leachi* na África do Sul<sup>13</sup>.

Com relação a epidemiologia das subespécies de *Babesia canis* no Brasil, a *B. canis vogeli* é a mais diagnosticada em cães, quando comparada as outras subespécies, independentemente da idade ou raça do animal<sup>14</sup>. Porém, há recentes estudos moleculares realizados no país relatando casos da doença causada pela *B. gibsoni*<sup>15</sup>.

As bactérias do gênero *Ehrlichia* são parasitas intracelulares obrigatórios gram-negativos que parasitam células hematopoiéticas, como monócitos, macrófagos e neutrófilos. Em diferentes partes do mundo, incluindo o continente americano, o carrapato *R. sanguineus* é o vetor principal, se não o único, da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC)<sup>7</sup>. A EMC, no Brasil, vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada, por muitos, como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais<sup>16,17</sup>.

O protozoário *R. vitalii* pertence a Ordem *Piroplasmorida* e infecta eritrócitos e células endoteliais de canídeos<sup>18</sup>. Em um trabalho recente realizado por Soares<sup>19</sup>, foi relatado que a espécie *A. aureolatum* demonstrou competência vetorial para *R. vitalii*, pois foi capaz de adquirir e transmitir o agente entre cães domésticos, diferentemente das espécies *A. ovale*, *A. ti-grinum*, *A. cajennense* e *R. sanguineus*.

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias gram negativas intracelulares obrigatórias, algumas com potencial zoonótico em diferentes partes do mundo<sup>31</sup>. *R. rickettsii* é considerada a espécie mais patogênica<sup>33</sup>, sendo relatada em diferentes países como Estados Unidos da América (EUA), México, Canadá, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil<sup>20</sup>. Os carrapatos do gênero *Amblyomma* são os vetores da Febre Maculosa

brasileira (FMB), sendo *A. sculptum* (antigo *A. cajennense*), *A. aureolatum* e *A. ovale* (vetor da *R. parkeri*) consideradas as espécies mais importantes na transmissão da doença<sup>21,22</sup>.

O conhecimento dos patógenos mais frequentes na região estudada, assim como a associação com os vetores mais encontrados nesse tipo de ecossistema, auxiliam no direcionamento do diagnóstico definitivo e colaboram com a manutenção da saúde e do bem social da comunidade humana que reside na área. Tendo em vista estes fatores, este trabalho teve por objetivo o diagnóstico molecular quanto a presença de *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma platys*, *Rangelia vitalii*, *Babesia canis vogeli* em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Santo Amaro, localizado na zona sul do município de São Paulo, SP, Brasil.

## MÉTODOS

Foi utilizado sangue total colhido entre janeiro e dezembro de 2017, de 63 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro (UNISA), residentes na zona sul da cidade de São Paulo, em áreas de fragmentação de mata atlântica aos arredores da Represa de Guarapiranga (23° 42' 0" S; 46° 42' 0" W)<sup>23</sup>. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Santo Amaro (CEUA 17/2018).

As amostras de sangue total foram processadas individualmente. A extração de DNA foi realizada com o Kit de extração Purelink Genomic DNA (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante. Os eluatos obtidos de DNA foram devidamente identificados e armazenados a -20° C para posterior análise molecular.

A PCR em tempo real para *Anaplasma platys* foi realizada através da amplificação do gene 18s rRNA, com os primers An-1-F e An2-R, associados a uma sonda interna específica (6FAM-CGGATTTTTGTCGTAGCTTGCTATGATQSY)<sup>24</sup>.

A PCR em tempo real para *Babesia canis vogeli* foi realizada utilizando-se os primers senso hsp70-F e antisenso hsp70-R associados a uma sonda interna fluorogênica específica (5'-Hex/AGCGCCAGGCCACCAAGGACGCT-3'-IABlkFQ), obtendo-se à amplificação de um fragmento do gene hsp70<sup>25</sup>.

Para *E. canis*, a PCR em tempo real foi realizada utilizando-se os primers Dsb-321 e Dsb-671, além da sonda específica TaqMan (5'-AGCTAGTGCTGCTTGGGCACTTTGAGTGAA-3') 5' FAM/BHQ - 1 3', obtendo-se uma sequência de nucleotídeos amplificados do gene *dsb*<sup>26</sup>.

A PCR em tempo real para *R. vitalii* utilizou os oligonucleotídeos iniciadores denominados senso Rv751-770 e antisenso Rv930-91, além de sonda TaqMan [5'-6-FAM (CCT TAT CAA ATC ATT CTT C) MGB NFQ -3']. Este par de primers corresponde à amplificação de um fragmento do gene hsp70<sup>27</sup>.

Para detecção de *Rickettsia rickettsii* através de PCR em tempo real foi utilizado o par de primers CS5 e CS6 que amplificam um fragmento do gene citrato sintase de *Rickettsia* spp., associado a uma sonda interna fluorogênica (5' 6-FAM - BHQ-1 3')<sup>28</sup>.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95° C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por um minuto<sup>28</sup>. A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas através do sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems - Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA).

## RESULTADOS

Das 63 amostras de cães testadas, quinze (23,8%) foram positivas na PCR em tempo real para pelo menos um agente estudado. Destas: 6 (9,52%) para *Babesia canis vogeli* e 9 (14,2%) para *Ehrlichia canis*. Nenhuma amostra foi positiva para *Rickettsia rickettsii*, *Rangelia vitalii* e *Anaplasma platys*.

## DISCUSSÃO

As doenças transmitidas por carrapatos representam parcela importante da clínica médica humana e veterinária do mundo todo, com um ciclo envolvendo vertebrados e invertebrados interagindo em biomas em constantes mudanças<sup>29</sup>. A cidade de São Paulo é caracterizada por variações do clima tropical, com presença de fragmentos de Mata Atlântica<sup>23</sup>. Apesar deste bioma possuir condições climáticas propícias para o desenvolvimento de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp.<sup>30</sup>, nenhuma amostra foi positiva para *R. vitalii* e *R. rickettsii*.

Das 63 amostras analisadas, 15 (23,8%) foram positivas para ao menos um patógeno. Na última década, pesquisas moleculares em locais distintos do Brasil relataram dados diferentes. Um estudo na cidade de Recife, em área ambiental semelhante ao do presente estudo, detectou 45,35% de positividade nas amostras de cães analisadas para *E. canis*, *B. canis vogeli* e *A. platys*<sup>31</sup>, porém, no Maranhão em uma área de transição entre Floresta Equatorial e Cerrado, em apenas 3,7% de 322 amostras foi detectado o DNA para *B. canis vogeli* e *E. canis*<sup>32</sup>. É importante ressaltar que devido o comportamento nidícola do *R. sanguineus* s.l., as diferenças ambientais pouco impactam na infestação ambiental deste vetor<sup>29</sup>, sugerindo que o manejo sanitário e a guarda responsável são condutas importantes no controle dessas hemoparasitoses. Um outro fator que pode ter contribuído para a divergência entre os dados foram os métodos de amostragens utilizados nos estudos.

No presente estudo foi possível a detecção, através da PCR em tempo real, de 9,52% (6/63) das amostras para *B. canis vogeli* e 14,2% (9/63) para *E. canis*. Todos esses agentes são transmitidos pelo *R. sanguineus* s.l. que por possuir comportamento nidícolas e domicílios urbanos como habitat<sup>29</sup>, encontra na grande área urbana da região metropolitana de São Paulo e, no grande número de cães domésticos, condições ideais para sua manutenção e transmissão dos patógenos.

Apesar de não ter sido observada a detecção de *Anaplasma platys*, sua presença já foi descrita no Rio Grande do Sul<sup>33</sup> com frequência de 14,05% em amostras de cães coletadas entre 2007 e 2009. No Brasil, temos duas populações diferentes de *Rhipicephalus sanguineus* s.l., uma que é encontrada nas regiões tropicais e a outra em subtropicais, e são necessários mais estudos para verificar se a competência vetorial para este patógeno ocorre da mesma maneira entre as duas populações, o que poderia explicar a diferença entre os dois estudos; conforme foi observado para *E. canis*<sup>34</sup>.

Das amostras analisadas, 9,52% (6/63) foram positivas para *Babesia canis vogeli* em infecção única. Castelli e colaboradores<sup>35</sup> em um estudo realizado em um condomínio residencial na cidade de Embu Guaçu, SP, área de fragmentação de Mata Atlântica, encontrou 16,25% (13/80) de positividade em amostras de cães para *Babesia canis vogeli*. Azevedo e colaboradores<sup>36</sup>, em trabalho científico realizado em um abrigo de animais no município de São Bernardo do Campo, SP, em área ambiental semelhante ao nosso estudo, encontraram 20,9% (17/81) dos cães positivos para *Babesia canis vogeli*. Uma hipótese que poderia explicar essas diferenças é a caracterização da população dos animais amostrados. A alta densidade populacional canina encontrada no abrigo e no condomínio poderia favorecer tanto o aumento do número de carrapatos da espécie *R. sanguineus* e sua permanência no meio ambiente, quanto a circulação do patógeno na população canina<sup>35, 36</sup>.

A PCR em tempo real para *E. canis* foi positiva, como infecção única, em 9/63 (14,2%) das amostras analisadas. Casos de infecção humana por *Ehrlichia canis* associados ao carrapato *R. sanguineus* foram relatados na Venezuela, causando uma doença chamada Erliquiose Monocítica em humanos (EMH)<sup>37</sup> e, há relatos na literatura científica de parasitismo em humanos por *R. sanguineus* em Pernambuco<sup>38</sup>, sugerindo a necessidade

de novos estudos científicos para elucidar o caráter zoonótico do agente no Brasil.

Nenhuma amostra foi positiva para *R. vitalii*, mesmo já tendo sido descrita na zona norte da cidade, em uma área de fragmentação de Mata Atlântica<sup>39</sup>, o que sugere a necessidade do monitoramento deste patógeno na região sul, pois essa infecção pode causar doença severa em cães domésticos<sup>40</sup>.

Apesar dos animais testados residirem perto a regiões com fragmentos de Mata Atlântica, ambiente propício para o desenvolvimento dos vetores do gênero *Amblyomma*<sup>21, 30</sup>, nenhuma amostra foi positiva para *R. rickettsii*. Até o momento, existe apenas um relato de *R. rickettsii* em cães no Brasil<sup>41</sup>. Devido os cães amplificarem a bactéria na circulação sistêmica por um curto período e posteriormente se tornarem imunes ao longo da vida, não podemos concluir que os animais do presente estudo não tiveram contato com o agente patogênico<sup>42</sup>. É importante ressaltar que *R. sanguineus* s.l também demonstrou ser um vetor competente de *R. rickettsii* para cães<sup>42</sup> e é reconhecido como o principal vetor da bactéria para humanos em algumas áreas do norte do México<sup>43</sup>.

A detecção de DNA de *B. canis vogeli* e *E. canis* em cães residentes de áreas de fragmentação de Mata Atlântica, aos arredores da Represa de Guarapiranga na zona sul da cidade de São Paulo de maneira inédita ampliam o conhecimento da dispersão desse agente no País e; o papel do *R. sanguineus* s.l. como vetor de agentes patogênicos no Brasil não pode ser negligenciado.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) por todo o apoio financeiro (número do processo 2016 / 00167-0).

## REFERÊNCIAS

- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. Trends Parasitol., v.25, p.157-163, 2009.
- SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends Parasitol, v.17, n.2, p.74-80, 2001.
- IRWIN, P.J.; HUTCHINSON, G.W. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. Aust Vet J, v.68, p.204-209, 1991.
- HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. Veterinary Record, v.141, p. 360-363, 1997.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; et al. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. Rev. Bras. Parasitol. Vet., n.17, n.1, p. 5-8, 2008.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. 2001. 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 75 *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. System. Evolut. Microb., v.51, p. 2145-2165, 2001.
- HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E. et al. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. Vet Rec, v.141, p.247-250, 1997b.
- SANOGO, Y.O.; DAVOUST, B.; INOKUMA, H.; CAMICAS, J.L.;

- PAROLA, P.; BROUQUI, P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. *Onderstepoort J Vet Res.*, v.70, p.205-212, 2003.
9. PAROLA, P.; CORNET, J.P.; SANOGO, Y.O.; MILLER, R.S.; THIEN, H.V.; GONZALEZ, J.P. et al. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J Clin Microbiol.*, v.41, p.1600-1608, 2003.
  10. MURASE, T.; IWAI, M.; MAEDE, Y. Direct evidence for preferential multiplication of *Babesia gibsoni* in young erythrocytes. *Parasitology Research*, v. 4, n. 79, p. 269- 71, 1993.
  11. CITARD, T. et al. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed restriction fragment length polymorphism analysis. *Tropical Medical Parasitology*, v. 46, n. 3, p. 172-179, 1995.
  12. SCHETTERS, T. P. et al. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology*, v. 115, n. 5, p. 485-493, 1997.
  13. CARRET, C. et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotical Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.
  14. 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. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.
  15. TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; DE MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*, v.140, n.3-4, p.223-230, 2006.
  16. DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. *Vet. Parasit.*, v. 117, p. 285- 290, 2003.
  17. AGUIAR, D.M., CAVALCANTE, G.T., PINTER, A., GENNARI, S.M., CAMARGO, L.M.A., LABRUNA, M.B. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. *Jour. Med. Entom.*, v. 44, p. 126-132, 2007.
  18. LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães (Nambivú, Peste de Sangue): uma revisão crítica sobre o assunto. *Arqs. Inst. Biológico, São Paulo*, v.71, p.101-131, 2004.
  19. SOARES, J.F., COSTA, F.B., GIROTTO-SOARES, A., DA SILVA, A.S., FRANÇA, R.T., TANIWAKI, S.A., DALL'AGNOL, B., RECKB, J., HAGIWARA, M.K., LABRUNA, M.B. 2018. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliellosis. *Ticks and Tick-borne Dis.*, v.9, p.1221-1234, 2018.
  20. DUMLER, J.S.; WALKER, D.H. 2005. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. *N. Engl. J. Med.*, v.353, p.551- 553, 2005.
  21. PINTER, A.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. 2004. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Ent.*, v.41, p.324-332, 2004.
  22. MORAES-FILHO, J. Brazilian Spotted Fever. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v.15, p.38-45, 2017.
  23. SÃO PAULO (Estado). Secretaria municipal de implementação das Subprefeituras. Grupo de articulação para elaboração dos planos diretores. São Paulo (SP), 2002.
  24. KHATAT, S.E.; DAMINET, S.; KACHANI, M.; LEUTENEGGER, C.M.; DUCHATEAU, L.; AMRI, H.E.; HING, M.; AZRIB, R.; SAHIBI, H. *Anaplasma* spp. in dogs and owners in north-western Morocco. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, 202, 2017.
  25. PAULINO, P.G.; PIRES, M.S.; DA SILVA C.B.; PECKLE, M., DA COSTA, R.L.; VITARI, G.L.V.; DE ABREU, A.P.M.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A. Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, v. 13, p. 160-165, 2018.
  26. DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B., TANG, Y.W., CORSTVET, R.E., HEGARTY, B.C., BLOCH, K.C., LI, P., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *J. Mol. Diagn.*, v.7, n.4, p.504-510, 2005.
  27. SOARES, J. F., GIROTTO, A., BRANDÃO, P.E., SILVA, A.S., FRANÇA, R.T., LOPES, S.T.A., LABRUNA, M.B. 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasit.*, v.180, n.3, p.153-167, 2011.
  28. LABRUNA, M.B., WHITWORTH, T., HORTA, M.C., BOUYER, D.H., MCBRIDE, J.W., 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.
  29. DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol*, v.152:173-185, 2008.
  30. SCINACHI, C.A.; TAKEDA, G.A.; MUCCI, L.F.; PINTER, A. 2017. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. *Acta Trop.*, v.166, p.225-233, 2017.
  31. RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol Res.*, v.107, n.5, p.1115-1120, 2010.
  32. COSTA, A. P. et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, vol.24, n.1, 2015.
  33. LASTA, C.S., DOS SANTOS, A.P., MESSICK, J.B., OLIVEIRA, S.T., BIONDO, A.W., VIEIRA, R.F.C., DALMOLIN, M.L., GONZÁLEZ, F.H.D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.22, 360- 366, 2013.
  34. MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK F.S.; COSTA F.B.; SOARES J.F.; LABRUNA, M.B. Comparative evaluation of the vector competence of four south American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *Plos One*, v.10, n.9, e0139386, 2015.
  35. CASTELLI, G.S.N.; FREITAS, R.C.; SILVA, R.E.; COSTA, J.O.J.; TONHOSOLO, R.; MORAES FILHO, J.; MARCILI, A. Molecular detection of *Leishmania infantum*, *Babesia vogeli*, and *Rangelia vitalii* in dogs from the Embu-Guaçú municipality around the Guarapiranga Reservoir, São Paulo. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.6, p. 35577-35585, 2020.
  36. AZEVEDO, R.C.F.; CASTELLI, G.S.N.; SILVA, R.E.; COSTA, J.O.J.; TONHOSOLO, R.; REIS, E.A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A. Levantamento de protozoários transmitidos por vetores em cães de um fragmento de Mata Atlântica nos arredores da Barragem Billings, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.50, n.9, 2020.
  37. PEREZ, M., BODOR, M., ZHANG, C., XIONG, Q., RIKIHISA, Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1078, p.110-117, 2006.
  38. DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the Brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc.*

- Bras. Med. Trop.**, v.39, p.64-67, 2006.
39. FIGURA, B.R.; LABRUNA, M.B.; MARCILI, A.; SANTOS, C.R.; BASTOS, B.B.B.; BORDIN, J.T.; MORAES-FILHO, J. *Rangelia vitalii* infection in a dog from São Paulo city, Brazil: case report. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.56, n.3, e150791-e150791.
40. LEMOS, T. D.; TOMA, H. K.; ASSAD, R. Q.; SILVA, A. V.; CORRÊA, R. G. B.; ALMONSNY, N. R. P. 2017. Clinical and hematological evaluation of *Rangelia vitalli*-naturally infected dogs in southeastern Brazil. **Rev. Bras. Paras. Vet.**, v.26, p.307-313, 2017.
41. LABRUNA, M.B., MORAES-FILHO, J., KAMAKURA, O., HORTA, M., PACHECO, R.C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.458-460, 2009.
42. PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; CANÇADO, P.H.D.; LABRUNA, M.B., 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.11, p.29-36, 2011.
43. EREMEEVA, M.E.; ZAMBRANI, M.L.; ANAYA, L.; BEATI, L.; KARPATY, S.E.; SANTOS-SILVA, M.M., et al. 2011. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. **J. Med. Entomol.**, v.48, p.418-421, 2011.