UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ICA), Campus Unaí
Curso de Medicina Veterinária

Natália Gonçalves Silva

DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS HEMOPARASITAS DE CÃES DA CIDADE DE UNAÍ MINAS GERAIS

Unaí/MG
2023

Natália Gonçalves Silva

DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS HEMOPARASITAS DE CÃES DA CIDADE DE UNAÍ MINAS GERAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva

Unaí/MG

2023

Natália Gonçalves Silva

DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS HEMOPARASITAS DE CÃES DA CIDADE DE UNAÍ MINAS GERAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.
Orientador: Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva

Data de aprovação: ____/____/_____.

_____

Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa Silva
Instituto de Ciências Agrarias (ICA)
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri– UFVJM

_____

Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP Botucatu

_____

Profa. Dra. Thaís Rabelo dos Santos Doni
Instituto de Ciências Agrarias
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri– UFVJM

Unaí
2023

AGRADECIMENTOS

À minha mãe. Meu exemplo de mulher forte e guerreira, que me auxiliou durante essa trajetória e acreditou no meu futuro.

Aos meus amigos que me acompanharam durantes esses anos no curso, foram minha família, acreditaram que era possível e se mantiveram firmes até o final sempre comigo, “surtamos”, mas deu certo, Ana Carolina Nacif, Ana Karina e Diego Valerio.

Aos meus amigos que foram minha turma antes da pandemia, agradeço por todo apoio, paciência e aprendizado que obtive com vocês, vocês foram muito parceiros e essenciais nessa caminhada: Sávio Alves, Milena Montijo, Maria Gabriela, André Borges, Caio Veloso e Jordanna Katarina.

Aos meus amigos que fiz em Unaí, principalmente após a pandemia, vocês foram meu abrigo quando eu mais precisei: Lucas Adriel, Hernandes Benício, Thiarles Martins, Nicole Sousa, Mateus José, Miguel Borges, Carine Soares e Valdivino Junior.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em especial ao Instituto de Ciências Agrárias e todos docentes, técnicos e terceirizados por usufruir e vivenciar um ensino público, gratuito e de qualidade.

Aos meus mentores por tudo que me ensinaram durante a graduação e por todo apoio e incentivo, Prof. Paulo Fernades Marcusso, Prof. Jenevaldo Barbosa, Profa. Jeanne Broch, Prof. Eduardo Fioratti e Profa. Cláudia Braga e Profa. Thaís Rabelo, e a Dra. Janne Paula.

Agradecer à Médica Veterinária Dra. Rozilei, por toda paciência e aprendizado durante o estágio realizado sob sua supervisão, e pela compreensão e apoio. Á Médica Veterinária e colega Laura Magalhães por todo o trabalho realizado, parceria e disponibilidade. Sem vocês seria impossível a realização desse trabalho.

À Clinica Pet Stop e em especial a Dra. Médica Veterinária Juliana Mori pela oportunidade de estágio, e conhecimento adquirido na prática, e por todos os dados obtidos para essa pesquisa.

Ao meu companheiro e amigo Ronaldo Bruno, por ser meu apoio e estar comigo sempre.

Aos meus “cãopanheiros” por serem meus fiéis parceiros e incentivo ao realizar um sonho, Bilu e ShikaNara, à Marcelinha e Cacau por marcarem minha vida e por permitirem compreendê-los.

A todos dos animais que estive em contato, por todo aprendizado, prática e ensino.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Principais raças de cães positivos para os hemoparasitas *Ehrlichia, Anaplasma* e *Babesia* da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.....**30**

Gráfico 2- Idade dos cães com Ehrlichiose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.....**31**

Gráfico 3- Idade dos cães com Anaplasmose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo..... **32**

Gráfico 4- Idade dos cães com Babesiose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos para as principais hemoparasitoses encontradas, entretanto, para Babesiose foi realizado somente o método direto em esfregaço sanguíneo.....**32**

Gráfico 5- Idade dos cães com Anaplasmose e Ehrlichiose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães

positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.....**33**

Gráfico 6- Idade de cães positivos para Leishmaniose da região Noroeste de Minas Gerais durante o ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 43 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto ELISA, RIFI D.T, e pelo método direto em esfregaço sanguíneo. Os cães apresentavam idades que variam entre 2 meses a 16 anos.....**39**

Gráfico 7- Número de cães positivos para Leishmaniose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022 diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 43 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto ELISA, RIFI D.T, e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.....**40**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Visualização sugestiva de *Ehrlichia spp.* dentro de células mononucleadas observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.....**28**

Figura 2- Visualização sugestiva de *Anaplasma spp.* dentro de plaquetas observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.....**28**

Figura 3- Visualização sugestiva de *Babesia spp.* dentro de hemácias observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.....**29**

Figura 4- Visualização sugestiva de *Leishmania spp.* dentro de células mononucleadas observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.....**29**

DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS HEMOPARASITAS DE CÃES DA CIDADE DE UNAÍ MINAS GERAIS

Natália Gonçalves Silva[1], Jenevaldo Barbosa da Silva[2]

RESUMO

As hemoparasitoses são enfermidades transmitidas por artrópodes hematófagos parasitados por patógenos que infectam as células sanguíneas dos animais. Os carrapatos são os principais vetores desses hemoparasitas. As mais frequentes hemoparasitoses na espécie canina são a Leishmaniose, Ehrlichiose, Anaplasmose, Babesiose e Hepatozoonose. No presente estudo foram analisados os dados dos cães que tinham suspeita de hemoparasitoses durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, laudados no Laboratório Clínico Veterinário pertencente a Clínica Veterinária Pet Stop, localizada em Unaí, MG. O diagnóstico laboratorial das hemoparasitoses era feito por meio de exames diretos e indiretos para detecção do hemoparasita e/ou anticorpos. Animais com suspeita das hemoparasitoses Ehrlichioses, Anaplasmoses, realizavam o *SNAP 4Dx Plus IDEXX Laboratories®*. Os métodos indiretos realizados para detecção de leishmaniose foram os métodos sorológicos ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) e o RIFI D.T. (Reação de Imunofluorescência Indireta Diluição Total) sendo realizados pelo Laboratório Hermes Pardini, laboratório particular situado na Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. O método direto era realizado em todas amostras que chegavam para realização do hemograma. Foram realizados 219 testes rápidos *SNAP 4Dx Plus* e Pesquisa Direta em esfregaço de sangue. Resultando em 89 positivos pelo *SNAP 4Dx Plus*, representando 41% dos testes realizados, e 44 foram positivos pelo método direto representando 33% dos cães positivos, totalizando 133 cães positivos. Foram positivos para 87 cães (65%) para Ehrlichiose, 41 cães (31%) para Anaplamose, 20 cães (15%) para Babesiose. Foram analisados raça, sexo, idade e parasita encontrado em cada cão. Foram realizados 173 exames no período de janeiro a dezembro do ano de 2022 para diagnóstico da Leishmaniose, resultando em 21 cães positivos e 7 inconclusivos pelo ELISA, 20 cães positivos para o RIFI D.T, 2 cães positivos pelo método direto. Concluindo que existe uma prevalência das principais hemoparasitoses que acometem os cães na cidade de Unaí, Minas Gerais, com Leishmaniose, Ehrlichiose, Anaplasmose e Babesiose encontradas. Supõe-se que a região é endêmica para Ehrlichiose, Anaplasmose e Babesiose, já que a Leishmaniose já é considerada endêmica. Os métodos de diagnósticos realizados nessa pesquisa foram essenciais, principalmente quando associados.

Palavras-chave: Ehrlichiose, Anaplasmose, Babesiose, Leishmaniose, hemoparasitoses, métodos de diagnóstico e espécie canina.

DIAGNOSIS OF THE MAIN HEMOPARASITES OF DOGS IN THE CITY OF UNAÍ MINAS GERAIS

Natália Gonçalves Silva[1], Jenevaldo Barbosa da Silva[2]

ABSTRACT

Hemoparasitoses are diseases transmitted by hematophagous arthropods parasitized by pathogens that infect the blood cells of animals. Ticks are the main vectors of these hemoparasites. The most frequent hemoparasitoses in dogs are Leishmaniasis, Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Babesiosis and Hepatozoonosis. In the present study, data were analyzed from dogs that had suspected hemoparasitosis during the period from January to December of 2022, reported at the Veterinary Clinical Laboratory belonging to the Pet Stop Veterinary Clinic, located in Unaí, MG. The laboratory diagnosis of hemoparasites was made through direct and indirect tests to detect the hemoparasite and/or antibodies. Animals with suspected Ehrlichioses, Anaplasmoses hemoparasitosis, underwent SNAP 4Dx Plus IDEXX Laboratories®. The indirect methods performed for the detection of leishmaniasis were the serological methods ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) and the RIFI D.T. (Total Dilution Indirect Immunofluorescence Reaction) being carried out by Hermes Pardini Laboratory, a private laboratory located in the City of Belo Horizonte, Minas Gerais. The direct method was performed on all samples that arrived for the blood count. 219 rapid SNAP 4Dx Plus and Direct Lookup blood smear tests were performed. Resulting in 89 positives by the SNAP 4Dx Plus, representing 41% of the tests performed, and 44 were positive by the direct method, representing 33% of the positive dogs, totaling 133 positive dogs. 87 dogs (65%) were positive for Ehrlichiosis, 41 dogs (31%) for Anaplasmosis, 20 dogs (15%) for Babesiosis. Breed, sex, age and parasite found in each dog were analyzed. 173 tests were carried out from January to December of 2022 for the diagnosis of Leishmaniasis, resulting in 21 positive dogs and 7 inconclusive by ELISA, 20 positive dogs by RIFI D.T, 2 positive dogs by the direct method. Concluding that there is a prevalence of the main hemoparasites that affect dogs in the city of Unaí, Minas Gerais, with Leishmaniasis, Ehrlichiosis, Anaplasmosis and Babesiosis found. It is assumed that the region is endemic for Ehrlichiosis, Anaplasmosis and Babesiosis, since Leishmaniasis is already considered endemic. The diagnostic methods performed in this research were essential, especially when associated.

Keywords: Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Babesiosis, Leishmaniasis, hemoparasitoses, diagnostic methods and canine species.

SUMÁRIO

1.0- ABSTRAT

2.0- INTRODUÇÃO 06

3.0- OBJETIVOS 08

3.1 OBJETIVOS GERAL 08

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 08

4.0- REVISÃO DE LITERATURA 09

4.1- HEMOPARASITOSES 09

4.2- LEISHMANIOSE 09

4.3- EHRLICHIOSE 12

4.4- BABESIOSE 14

4.5- ANAPLASMOSE 16

4.6- HEPATOZOONOSE 18

4.7- MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS PARA AS PRINCIPAIS HEMOPARASITOSES 19

4.8- EXAMES HEMATOLÓGICOS 20

4.9- EXAME DIRETO 20

4.10- TESTES SOROLOGICOS 22

4.11- TESTES MOLECULARES 23

5.0- MATERIAL E MÉTODOS 25

6.0- RESULTADOS 27

6.1- EHRLICHIOSE, ANAPLASMOSE, BABESIOSE E HEPATOZOONOSE 27

6.2- LEISHMANIOSE 38

7.0- DISCUSSÃO 41

7.1- DISCUSSÃO: EHRLICHIOSE, ANAPLASMOSE, BABESIOSE E HEPATOZOONOSE 41

7.2- DISCUSSÃO: LEISHMANIOSE 48

8.0- CONSIDERAÇÕES FINAIS 51

9.0- REFERÊNCIAS 52

2.0 INTRODUÇÃO

O cão *(Canis Familiaris)* é a espécie domesticada mais antiga e tem uma relação de proximidade com humanos, sendo considerado o animal de estimação número um no mundo (Lima, 2021). Cerca de 44% dos lares brasileiros possuem pelo menos um cachorro, isso contempla aproximadamente 29 milhões de residências (Souza, 2021). Essa relação de convívio entre humanos e animais está diretamente interligada à saúde e a medicina preventiva, levando a uma preocupação quanto aos riscos de afecções por endoparasitos e/ou ectoparasitos e pelo risco de zoonoses (Pereira; Lima, 2021).

Os animais acometidos por ectoparasitas como pulgas e carrapatos, e por insetos como os flebotomíneos, podem adquirir e transmitir doenças de natureza microbiológica, como as hemoparasitoses. As hemoparasitoses são doenças parasitárias obrigatórias de células sanguíneas que causam reações ao organismo animal. Os principais agentes causadores de hemoparasitoses na espécie canina são os gêneros *Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Leishmania e Hepatozoon*. Geralmente, essas hemoparasitoses são diagnosticadas na rotina médico veterinária e podem variar conforme apresentação dos sinais clínicos levando a sinais multissistêmicos. Podem ocorrer de forma assintomática, e o animal ser reservatório para transmissão da doença para outros animais e ao humano, ou mesmo levar ao óbito (Pereira, 2021).

Essas doenças geralmente ocorrem em locais com clima tropical onde existe uma ampla propagação de carrapatos e flebotomíneos, como acontece no Brasil. Duas espécies de carrapatos são mais frequentes, o *Rhipicephalus sanguineus* no ambiente urbano e o *Amblyomma cajennense* no ambiente rural. No entanto estudos demonstraram que a ausência de carrapato não é indicativa de animais negativos para Ehrlichiose, Anaplasmose, Babesiose, e Hepatozoonose, pois anticorpos podem retratar infecções passadas, o que torna o diagnóstico dessas enfermidades um desafio aos médicos veterinários. Quanto aos flebotomíneos, a *Lutzomyia longipalpis* é predominante em regiões consideradas endêmicas para Leishmaniose, e é uma das poucas espécies que se adaptou facilmente ao ambiente urbano (Lima, 2021; Pereira, 2021; Oliveira, 2021).

Assim, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento epidemiológico sobre as principais hemoparasitoses que acometem os cães da cidade de Unaí, Minas Gerais no ano

de 2022, e analisar quais foram os métodos de diagnóstico utilizados para as principais hemoparasitoses encontradas.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Realizar um levantamento epidemiológico sobre as principais hemoparasitoses diagnosticadas no ano de 2022 nos cães da cidade de Unaí Minas Gerais, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar quais as mais frequentes hemoparasitoses em cães;
- Identificar se existe sazonalidade na ocorrência de hemoparasitoses em cães;
- Correlacionar possíveis fatores associados à ocorrência de hemoparasitoses em cães;
- Correlacionar as hemoparasitoses e os métodos de diagnóstico utilizados;

4.0 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HEMOPARASITOSES

As hemoparasitoses são enfermidades transmitidas por artrópodes hematófagos parasitados por microrganismos patógenos que infectam as células sanguíneas dos animais. Os carrapatos são os principais vetores dessas hemoparasitoses (Araújo *et al.*, 2022).

A hemoparasitoses mais frequente de ocorrer na espécie canina são a Leishmaniose, Ehrlichiose, Anaplasmose, Babesiose e Hepatozoonose (Araújo *et al.*, 2022*;* Lima, 2021).

4.2 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença infecciosa considerada uma zoonose de importância em saúde pública. É causada por diferentes espécies de protozoários digenéticos da Ordem *Kinetoplastidae*, Família *Trypanosomatidae*, Gênero *Leishmania.* Possui diversas formas de apresentação, e é caracterizada por parasitismo de células do sistema mononuclear fagocítico da derme, mucosas ou órgãos, como fígado e baço, e medula óssea (Valente, 2014; Costa *et al*., 2020).

Cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* são causadoras de afecções cutâneas e viscerais em seres humanos e outros mamíferos. Das espécies associadas à Leishmaniose Visceral (LV), encontram-se as do complexo donovani, dentre essas, incluem-se *Leishmania (Leishmania) donovani* encontradas no velho mundo e a *L. (L.) infantum chagasi* no novo mundo. Na América latina cerca de 90% dos casos de leishmaniose ocorrem no Brasil sendo que a Leishmaniose Visceral é considerada zoonótica no país. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) a LV é considerada uma das doenças parasitárias mais preocupantes mundialmente e também a mais relatada. Os cães desempenham um papel fundamental na cadeia epidemiológica e são considerados os principais reservatórios para a doença em seres humanos (Valente, 2014; Costa, *et al.*, 2020).

O principal transmissor da Leishmaniose é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, pertencente à Família *Pshychodidae* e a subfamília *Phlebotominae*. É encontrada em áreas que dependem da presença do vetor e do hospedeiro suscetível, e é através da picada de fêmeas de *L. (L.) longipalpis* infectadas que ocorre a inoculação de promastigotas metacíclicas nomeadas formas infectantes, e também a transmissão do parasito para o homem e para os outros

hospedeiros mamíferos como os cães. Estes flebotomíneos são conhecidos como mosquito palha ou birigui, e são insetos que se reproduzem em locais com muita matéria orgânica em decomposição (Valente, 2014; Costa, *et al.*, 2020).

Cães portadores da Leishmaniose visceral podem apresentar sintomatologia de diferentes formas, a depender da resposta imunológica do animal e da cepa do parasito inoculado durante a picada do vetor. O *status* clínico é classificado quanto à intensidade e os sinais clínicos apresentados. A enfermidade pode apresentar a forma clínica assintomática, oligossintomática e sintomática. Caso o animal não apresenta sinais clínicos evidentes da infecção é classificada como forma assintomática. Quando manifesta até dois sinais clínicos e geralmente inespecíficos é classificada como oligossintomática. Já a forma sintomática, pode-se observar várias alterações clínicas, como linfadenopatia localizada ou generalizada, polidipsia, poliúria, êmese, polimiosite, poliartrite, neuralgia, febre, onicogrifose, esplenomegalia, ascite, anemia, emagrecimento exagerado, perda de apetite, hiperqueratose, alopecia, descamação da pele, eczema nas orelhas e focinho, ulcerações, epistaxe, uveíte, ceratoconjuntivite, blefarite, diarreia, apatia, sonolência, edema nas patas e periostite (Valente, 2014; Júnior *et al.*, 2021).

Na leishmaniose Visceral Canina (LVC) os sinais clínicos mais comuns são: alterações cutâneas como alopecia, hiperqueratose e ulcerações, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, hepatoesplenomegalia, onicogrifose, anorexia, apatia e hipertermia. Outros sinais clínicos menos comuns, mas que podem ser encontrados são: alterações renais, locomotoras, reprodutivas, oftálmicas e neurológicas. Porém, para cães infectados pela *L. (L.) infantum/chagasi* a maioria não apresenta sinais, o que dificulta o seu diagnóstico (Valente; 2014). Além disso, Costa *et al.*, (2020), complementa que o diagnóstico da LVC é complexo devido a variedade e a falta de especificidade de sinais clínicos, além dos custos dos exames ser um fator limitante, e dos animais se manterem assintomáticos por toda a vida.

Para chegar ao diagnóstico definitivo da leishmaniose, não se pode basear apenas nas manifestações clínicas, e alterações hematológicas, pois a maioria dos sintomas e alterações clínicas patológicas apresentados por animais com Leishmaniose são comuns a outras patologias caninas, como por exemplo, Ehrlichiose e Babesiose. A imunossupressão causada por essas afecções pode gerar infecções oportunistas secundarias, dificultando ainda mais o

diagnóstico clínico da LVC e aumentando a necessidade da utilização de métodos diagnósticos mais específicos para a enfermidade (Valente, 2014; Júnior, 2021).

De acordo com Costa, *et al.* (2020) é recomendado realizar a combinação de vários exames e a observação dos sinais clínicos para obtenção do diagnóstico mais seguro, pois a detecção precoce de cães infectados pode impedir a propagação da doença, e o seu controle.

Segundo Valente, (2014) os testes sorológicos como o ELISA e RIFI foram importantes no diagnóstico da Leishmaniose, e que foram usados como ferramentas em estudos epidemiológicos principalmente em áreas consideradas endêmicas. E que foram desenvolvidas novas técnicas diagnósticas como a Imunohistoquímica para a detecção do parasita e a PCR na pesquisa do DNA do agente, demonstrando possuir alta sensibilidade no diagnóstico da LVC. Além disso, o exame parasitológico direto é tido como um método de alta especificidade na pesquisa de *Leishmania sp*., podendo chegar a 100% de especificidade e de sensibilidade variável, pois a distribuição tecidual não é homogênea. Quanto às formas amastigotas do parasito, podem ser observadas em biópsia de pele, aspirados de linfonodos, medula óssea, baço e biópsia hepática, corados com os corantes do tipo *Romanowsky*. Entretanto, no exame direto a menor carga parasitária tecidual encontrada em animais assintomáticos torna comum a detecção de amostras negativas, o que torna necessário realizar outros métodos diagnósticos.

Segundo Júnior *et al.*, (2021), os exames sorológicos mais utilizados, estão o Teste de aglutinação direta (TAD), RIFI, ELISA, sendo que no Brasil as técnicas recomendadas para os cães pelo Ministério da Saúde (MS), são o RIFI e ELISA. Além disso, descreve ainda que s testes sorológicos são utilizados devido a elevada quantidade de anticorpos, principalmente a imunoglobulina G (IgG), produzidas pelos animais infectados. Entretanto não apresentam 100% de sensibilidade e especificidade. Animais recém infectados ou que estão no período pré-patente, podem apresentar um resultado falso-negativo. A presença de doenças concomitantes também pode resultar em falso-positivo, bem como testes realizados em cães filhotes com idade inferior a 5 meses devido a presença dos anticorpos maternos.

A PCR é um método molecular utilizado na pesquisa do DNA do parasito, através de amostras extraídas de sangue total, pele, medula óssea, linfonodo e conjuntiva. com alta sensibilidade e especificidade. A sensibilidade e a especificidade da PCR podem variar de acordo com o tipo de amostra utilizada na reação. Apesar de sua qualidade no diagnóstico de

LVC, a PCR ainda não possui aplicabilidade devido ao seu alto custo e exigência de mão de obra especializada sendo mais utilizada em pesquisas e em casos inconclusivos da doença (Valente, 2014). Júnior *et al.*, (2021) denota que a PCR é considerada a mais específica e sensível para o diagnóstico da leishmaniose, mas que a sensibilidade é afetada por diversos fatores como metodologia utilizada para extração do DNA e amostras biológicas utilizadas. No entanto, a especificidade e sensibilidade, são maiores para amostras de materiais obtidas de linfonodos, baço, medula óssea e pele.

4.3 EHRLICHIOSE

A Ehrlichiose é uma enfermidade causada por parasitos que parasitam células sanguíneas de animais domésticos e silvestres, incluindo o homem. É transmitida por vetores como os carrapatos, e é uma das doenças mais comuns em cães. O agente *Ehrlichia canis* é o principal causador da Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) frequente nas regiões tropicais e subtropicais, como no Brasil, onde é considerada endêmica e favorece a replicação e abundância do vetor (Valente, 2014; Lima, 2021).

Sobre a taxonomia do parasito, esse faz parte do gênero *Ehrlichia* e pertence à Família *Anaplasmataceae*, inclui espécies de riquétsias de morfologia similar que se apresentam em colônias, mórulas, dentro de vacúolos citoplasmático, são classificadas como bactérias cocos, Gram-negativas e parasitas intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas, especialmente do sistema mononuclear fagocitário, como monócitos e macrófagos, e algumas espécies podem ser encontradas em granulócitos, como neutrófilos por exemplo. É conhecida como febre do carrapato, pancitopenia tropical canina, doença do carrapato, etc (Valente, 2014). Além disso, Lima, (2021) descreve em seus estudos que seu potencial zoonótico é discutível e outras espécies de *Ehrlichia* são patogênicas para humanos. Entretanto, apesar de alguns trabalhos detectarem níveis de anticorpos humanos, ainda não é considerada uma zoonose.

A *E. canis* possui como principal vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, presente em regiões urbanas do Brasil, e em menores densidades nas áreas rurais. É um carrapato ixodídeo comum no Brasil e tem uma preferência de se alimentar em cães domésticos. Nos carrapatos a infecção por *E. canis* ocorre ao ingerirem sangue de cão infectado em fase de parasitemia. O carrapato adquire as formas infectantes no momento que se alimenta de um cão infectado. O ectoparasito desce do animal para realizar sua muda de estágio e ocorre a

transmissão transestadial, perpetuando o ciclo. As larvas de carrapato, pode adquirir a bactéria no primeiro repasto sanguíneo, onde realiza a muda no ambiente, transmite a infecção para um novo hospedeiro mamífero, como o cão e durante a alimentação de larva, faz novamente a muda e transmite *E. canis* na fase adulta para um novo cão. Estudos evidenciam que este carrapato está disperso em todo o território nacional corroborando que existe uma alta relação com a distribuição geográfica da Ehrlichiose canina no país (Lima, 2021; Valente, 2014).

De acordo com Lima, (2021), a EC é descrita em três formas clínicas: aguda, subclínica e crônica. Na fase aguda da doença os sinais clínicos mais comuns de ocorrerem no cão são: febre, petéquias, anorexia, apatia, vômitos, diarreia, alopecia, epistaxe, uveíte e esplenomegalia. Quanto aos exames laboratoriais o cão pode ou não apresentar alterações, como trombocitopenia e diminuição na relação albumina: globulina sérica. Na fase subclínica os cães podem apresentar, alopecia generalizada, linfonodos aumentados e trombocitopenia. Já a fase crônica pode estar relacionada ao não tratamento da infecção na fase aguda e subclínica, apresentando os mesmos sinais clínicos da fase aguda, porém mais graves, como pancitopenia e ausência de resposta ao tratamento.

Segundo Valente, (2014), a maioria dos cães se recuperam da fase aguda após o tratamento adequado e alguns têm cura espontânea. Porém, animais não tratados ou tratados inadequadamente podem desenvolver a fase subclínica da doença. Na fase subclínica, os animais não apresentam sintomatologia clínica relevante, aparentando estarem saudáveis. Podem permanecer portadores do agente por meses e até anos, podendo debelar a infecção sem desenvolverem a fase crônica. Já na fase crônica, a doença apresenta maior letalidade, pois ocorre exacerbação dos sintomas descritos na fase aguda. Além disso, podem apresentar alterações como glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos seguida por síndrome nefrótica, infecções secundárias e hemorragias graves causadas pela hipoplasia das linhagens medulares.

O diagnostico presuntivo da infecção por *E. canis* em cães é baseado no conjunto de sinais clínicos e alterações hematológicas encontradas, mas são necessários mais exames para fechar o diagnóstico. Na fase subclínica a titulação de anticorpos é alta, portanto, é recomendado o teste sorológico periódico de animais em áreas endêmicas (Lima, 2021; Valente, 2014).

O método para confirmar a EMC é a identificação da mórula bacteriana dentro de monócitos na citologia de sangue ou medula óssea, possuindo maior sensibilidade na fase aguda da doença. Entretanto, pode ser confundida com *Anaplasma phagocytophilum* em neutrófilos, acarretando várias dificuldades no diagnóstico (Lima, 2021). De acordo com Araújo et al., (2022) o exame microscópico direto é realizado para verificar a presença ou não dos agentes infecciosos no sangue através do esfregaço sanguíneo de amostras de sangue de ponta de orelha, sangue proveniente de vasos mais calibrosos como jugular, cefálica ou safena ou de capa leucocitária, extraída do sangue dos vasos calibrosos. Mas em áreas endêmicas é comum associarem contagem de plaquetas e sinais clínicos, no entanto, alterações não-específicas ou ausentes são desafiantes (Lima, 2021). O exame microscópico direto através do esfregaço sanguíneo, os métodos sorológicos como RIFI e ELISA e o método molecular PCR são utilizados para concluir o diagnóstico (Pereira, 2021).

Estudos relataram que durante as fases subclínica e crônica da doença, a parasitemia é rara, e que para realização do PCR o uso do DNA de *E. canis* podem ser realizado a partir do material genético extraído de sangue total, medula óssea, linfonodo, soro e baço, sendo considerado mais sensível a partir de amostras esplênicas. A PCR é altamente sensível e específica no diagnóstico dessa riquétsia, e se destaca por detectar o DNA do agente nos primeiros dias pós-infecção, antes mesmo de ocorrer a soroconversão, e por ser incomum a apresentação de resultados falsos positivos (Valente, 2014). Para Lima, (2021), a PCR é recomendada nas fases crônicas e aguda da EMC, mas que atualmente os cientistas preferem recomendar a PCR como método confiável, por causa da habilidade da técnica e de detectar o material bacterianos ao invés da evidência de exposição por anticorpos de testes sorológicos dificultando seu uso na rotina. Complementa ainda que a detecção de fragmentos moleculares de *E.canis* em animais na fase subclínica é de baixa sensibilidade, variando a performance de acordo com o tecido usado de amostra de cada indivíduo.

4.4 BABESIOSE

A Babesiose canina é uma enfermidade causada por protozoários pertencentes ao Filo *Apicomplexa*, Classe *Piroplasma*, Ordem *Piroplasmida*, Família *Babesidae*, Genero *Babesia.* São parasitas intraeritrocitários e em cães as espécies *B. canis* e *B. gibsoni* são as principais identificadas causando a Babesiose canina (BC), porém, mais de 100 espécies são conhecidas.

A *B. canis* apresenta também uma classificação trinomial em subespécies *B. canis vogeli*, *B. canis canis* e *B. canis rossi* e são diferenciadas quanto a especificidade do vetor, imunidade cruzada e patogenicidade (Valente, 2014; Araújo, *et al.*, 2022).

As babesias são classificadas quanto a sua morfologia como grandes ou pequenas, de acordo com o tamanho dos merozoítos. Os merozoítos desse parasito são observados no interior das hemácias com diferentes formas na *B. canis*, sendo arredondada, piriforme ou elíptica, e geralmente aos pares, podendo ser encontrados até oito na mesma hemácia. A *B. canis* é uma babesia grande possuindo aproximadamente o dobro do tamanho da *B. gibsoni*, que é considerada pequena, ambas medindo aproximadamente 2,4 a 5 micrômetros e 1 a 3,2 micrômetros, respectivamente. A *B. gibsoni* pode ser observada individualmente, em piroplasma pequenos apresentando formato circular ou piriforme (Valente, 2014; Araújo, *et al.*, 2022).

No Brasil a Babesiose canina é comumente causada por *B. canis vogeli e B. gibsoni*, sendo a primeira com baixa a moderada patogenicidade e a segunda altamente patogênica. A distribuição geográfica do parasito e, consequentemente, da Babesiose estão relacionadas diretamente à distribuição dos carrapatos vetores ocorrendo principalmente em regiões de climas tropicais e subtropicais. O principal vetor invertebrado apontado como transmissor de *B. canis* é o carrapato *R. sanguineus*, embora a transmissão de *B. gibsoni* não esteja completamente esclarecida, este ixodídeo também é considerado transmissor (Valente, 2014; Pereira, 2021). De acordo com Araújo, *et al.*, (2022), a transmissão de *Babesia spp.* ocorre por meio da picada do carrapato vetor, que durante os repastos sanguíneos, libera das suas glândulas salivares os esporozoítos que penetram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Apresenta-se de forma hiperaguda, aguda ou crônica, podendo o mesmo animal ser assintomático e mesmo assim portador, e apresentar manifestações clínicas em episódios de estresse ou doenças concomitantes.

Para ocorrer a forma clínica da doença depende do quanto a cepa é patogênica, da imunidade do hospedeiro, idade e intensidade da parasitemia. A forma hiperaguda ocorre mais em filhotes e causa a forma grave da enfermidade, com grande resposta inflamatória, podendo cursar com choque endotóxico, coagulação intravascular disseminada (CID), icterícia e até sintomas neurológicos. Quanto a forma aguda da Babesiose, essa ocorre com mais frequência e os sinais observados vão desde mucosas pálidas, hepatoesplenomegalia, febre, perda de

apetite, icterícia, hemoglobinúria, taquicardia, taquipnéia e depressão. Alguns animais podem apresentar complicações no quadro clínico, como hepatopatia, insuficiência renal aguda, CID e síndromes respiratórias. A forma subclínica ocorre geralmente em cães que conseguiram debelar a infecção aguda, e se tornaram portadores do hemoparasita em órgãos, como baço e fígado, não apresentando sintomatologia evidente, assim, podendo evoluir para a forma crônica da enfermidade. Já na forma crônica os animais podem apresentar episódios de reagudização da doença, o que ocorre quando o animal apresenta doenças concomitantes ou situações de estresse e/ou de imunossupressão, levando a quadros de apatia, anorexia, prostração, petéquias, perda de apetite, febres intermitentes, mucosas hipocoradas e fraqueza (Valente, 2014; Araújo, *et al.*, 2022).

De acordo com Pereira, (2021), para conclusão do diagnóstico são necessários exames laboratoriais como, esfregaço sanguíneo pelo método direto, sorologia por RIFI e ELISA, e método molecular PCR. Para Valente, (2014), o diagnóstico é baseado no exame físico, na história clínica, na visualização do organismo dentro das hemácias em esfregaços de sangue periférico e capa leucocitária corados por corantes do tipo *Romanowsky* em animais com suspeitas, e na detecção de anticorpos circulantes por RIFI ou ELISA, e na amplificação de fragmentos de DNA pela técnica de PCR.

De acordo com Gonçalves *and* Botteon (2015), é possível a identificação do parasita nas hemácias através do esfregaço sanguíneo, porém nem sempre é viável principalmente em infecções pela *B. canis* que cursam com baixas parasitemias. Há uma maior chance de encontrar o parasita em coleta de sangue de capilares de extremidades, como ponta de orelha. O método sorológico RIFI é considerado especifico, mas pode haver reação cruzada entre *B. canis* e *B. gibsoni.* Possui alta sensibilidade, sendo capaz de detectar títulos maiores ou iguais a 1:80. O teste de ELISA embora tenha alta sensibilidade, tem menor especificidade que o RIFI. O melhor teste quanto ao quesito especificidade é por método de PCR, na qual detecta o DNA do parasita. Quanto à sensibilidade, o resultado negativo não exclui uma infecção.

4.5 ANAPLASMOSE

A Anaplasmose é conhecida como Trombocitopenia Cíclica Canina, é uma doença causada pelo agente etiológico, o *Anaplasma spp.*. É classificado como bactérias Gram-negativa e parasitas intracelulares obrigatórios que são visualizados isoladamente ou em

colônias nas células do hospedeiro, acomete principalmente a espécie canina. É parasita de plaquetas especificamente, e pertence ao Domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Alphaproteobacteria*, Ordem *Rickettsiales*, Familia *Anaplasmataceae* e Genero *Anaplasma* (Araújo *et al.*, 2022; Pereira, 2021).

É distribuída mundialmente e ocorre mais em locais de climas tropical e subtropical, como é o caso do Brasil, onde o carrapato é considerado o principal vetor. Nos animais duas espécies são descritas, o *Anaplasma phagocytophilum* presente em leucócitos polimorfonucleares e o *Anaplasma platys* em plaquetas e raros leucócitos (Araújo *et al.*, 2022).

Segundo Pereira, (2021), o agente *A. platys* leva a um quadro clínico conhecido como trombocitopenia infecciosa cíclica canina, afetando as plaquetas em sua maioria logo após a infecção, provocando trombocitopenia brusca e rápido desaparecimento do agente causador. Dessa forma, realiza ciclo infeccioso entre uma a duas semanas, sendo que em torno de quatro dias o número de plaquetas retorna a valores próximos ao normal. Assim, somente após o período de incubação transcorrido manifestam-se os sinais clínicos.

Araújo *et al.*, (2022) em seu estudo descreve que a terminologia "cíclica" é devido a característica da alternância dos valores plaquetários do animal infectado, apresentando parasitemia e trombocitopenia cíclica a intervalos de 10 a 14 dias após a infecção com *A. platys*. Os sinais clínicos descritos incluem febre moderada, uveíte, petéquias e equimoses, vômitos e/ou diarreia, anorexia, letargia, perda de peso, depressão e alterações hemostáticas como, trombocitopenia, anemia normocítica leve a moderada não regenerativa, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Além disso, como os sinais são inespecíficos pode haver animais que são assintomáticos, ou seja, não apresentam os sinais clínicos.

A utilização do esfregaço sanguíneo, feito de sangue total ou capa leucocitária, corado pelo método Giemsa ou pelo Novo Azul de Metileno, ou por coloração com Panótico rápido é um dos métodos de diagnóstico que permite a visualização de inclusões basofilicas nas plaquetas com formatos variados que vão desde de oval, a arredondado envolvidas por uma dupla membrana. No entanto, a identificação direta desses parasitas ao microscópio apresenta baixa sensibilidade, já que a parasitemia é cíclica, e pode cursar com baixo número de bactérias, dificultando visualizar células parasitadas. É importante realizar o diagnóstico diferencial do parasita para inclusões plaquetárias, como a presença de núcleos remanescentes de

megacariócitos ou granulações para não haver falso- positivos (Araújo *et al.*, 2022; Pereira, 2021).

Além disso, tem-se a utilização de métodos sorológicos como o RIFI e o ELISA para detecção de anticorpos contra o parasita, e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como método molecular, determinando a presença de material genético e espécie do agente, sendo considerados como métodos para diagnóstico da enfermidade (Pereira, 2021). Araújo *et al.*, (2022), complementa quando cita em seus estudos que há diversos testes sorológicos disponíveis, como o método de fixação de complemento, RIFI, ELISA, sendo o PCR o de escolha, pois possibilita a detecção direta do DNA de microrganismos do gênero *Anaplasma* em amostra de sangue e tecido, carrapatos e outros vetores.

4.6 HEPATOZOONOSE

A Hepatozoonose é uma enfermidade causada por um protozoário o *Hepatozoon spp.*, transmitida por artrópodes que podem atuar como hospedeiro definitivo, como carrapatos, ácaros, piolhos, entre outros mas, é mais comum ocorrer a transmissão pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e por algumas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, como *A. cajennense* e *A. ovale*,e também pelo o *R. (Boophilus)* (Peres, 2022; Araújo *et al.*, 2022).

O *Hepatozoon* é um hemoparasita que pertence ao filo *Protozoa*, subfilo *Apicomplexa*, a família *Hepatozoidae*, subordem *Adelorina* e ao gênero *Hepatozoon* apresentando mais de 300 espécies relatadas em infecções em animais como répteis, pássaros, marsupiais e mamíferos, acometendo principalmente carnívoros domésticos e silvestres. É relatado em várias regiões do mundo e existem duas principais espécies que infectam cães, a *Hepatozoon canis e Hepatozoon Americanum*. Nas duas espécies os dois protozoários são geneticamente distintos, assim como no seu aspecto clínico, patológicos e antigênicos, e no tipo de vetor transmissor (Araújo *et al.*, 2022; Souza, *and* Ohana, 2022; Peres, 2022; Santos, 2018).

Segundo Araújo *et al.*, (2022), a infecção do hospedeiro vertebrado, ou seja, do cão, acontece pela da ingestão de carrapatos com oocisto esporulados na hemocele que, no trato digestivo do animal se rompem liberando os esporozoítos. Após liberados, penetram na parede intestinal e pela corrente sanguínea chegam até outros órgãos como baço, linfonodos, fígado, medula óssea, pulmões e músculos, onde infectam fagócitos mononucleares e células

endoteliais, e formam cistos contendo macromerontes e micromerontes que se desenvolvem em micromerozoítos, sendo estes responsáveis pela infecção dos leucócitos e se desenvolvem em gamontes, que é a forma infectante para os carrapatos.

É uma zoonose que pode ter caráter assintomático, sem predisposição por raça, idade, podendo acometer principalmente cães jovens, e é comum estar associada a doenças imunossupressoras e a outras hemoparasitoses, como *Ehrlichia spp*. e *Babesia spp.* desencadeando os sinais clínicos. Os principais sinais clínicos são: anorexia, mucosas pálidas, febre, poliúria, polidipsia, vômitos, diarreia, fraqueza, depressão, ataxia dos membros posteriores, emaciação e linfadenopatia periférica, corrimento óculonasal, meningoencefalite e diarreia com sangue. (Peres, 2022; Almeida, 2020).

De acordo com Araújo *et al.*, (2022), os sinais clínicos da doença são inespecíficos, podendo o animal ser assintomático, ou mesmo apresentar um quadro severo ou fatal quando acompanhado por outras parasitoses ou comorbidade. O diagnóstico se dá através dos sinais clínicos quando presentes, e realização de exames parasitológicos de sangue, na qual se espera a visualização de gamontes parasitando leucócitos. Pode ser realizada a biópsia de músculo para verificar a presença de merogonia, imuno-histoquímica, sorologia e PCR. Quanto às alterações hematológicas, estas vão desde anemia, trombocitopenia, leucocitose e neutrofilia, além do aumento de fosfatase alcalina, que são mais acentuadas na presença de outras afecções.

Em estudos realizados por Peres, (2022), a enfermidade é diagnosticada esporadicamente em exames laboratoriais, como no caso do esfregaço sanguíneo corado pelo método Giemsa. No entanto, esse método pode apresentar baixa sensibilidade principalmente quando amostras de sangue não são coletadas na fase aguda da infecção, já que animais cronicamente infectados se encontram aparentemente sadios no momento do exame, e podem posteriormente desenvolver sintomatologia clínica. E o uso de metodologias moleculares para o diagnóstico do protozoário geralmente está restrito à pesquisa. Portanto, acredita-se que a ocorrência e o diagnóstico de hepatozoonose canina possa estar sendo menospreza na rotina clínico veterinária.

4.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS PARA AS PRINCIPAIS HEMOPARASITOSES

Diversas técnicas são utilizadas para auxiliar no diagnóstico clínico das hemoparasitoses pois associam os sintomas e alterações hematológicas, entretanto, apresentam

alterações semelhantes com outras enfermidades dificultando o diagnóstico. Métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares são em suma maioria definitivos para detecção de doenças causadas por hemoparasitas, como *Ehrlichia, Anaplasma, Babesia e Leishmania* e *Hepatozoon* (Valente, 2014).

Araújo, *et al.,* (2022), em seu trabalho cita que alguns autores visando complementar o diagnóstico das principais hemoparasitoses (Ehrlichiose, Anaplasmose, Babesiose e Leishmaniose) analisaram vários métodos de diagnostico, como: a pesquisa parasitológica direta em franja de esfregaço sanguíneo, capa leucocitária, esfregaço de sangue periférico, citologia de medula óssea e linfonodo, testes Sorológicos, Cultura e a PCR.

4.8 EXAMES HEMATOLÓGICOS

De acordo com Araújo *et al.*, (2022) os parâmetros hematológicos isoladamente não permitem a realização do diagnóstico de hemoparasitoses, pois não possibilitam a identificação do agente. Animais infectados podem apresentar diferentes alterações em seus resultados ou mesmo nenhuma. Quando manifestadas, as principais alterações observadas no hemograma são: anemia de graus variados (normocítica normocrômica, normocítica hipocrômica, microcítica hipocrômica), policromasia, anisocitose, leucocitose ou leucopenia, eosinopenia, trombocitopenia e desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda. E nos exames bioquímicos, alterações do número de proteínas plasmáticas e elevação de ALT e FA são as mais relatadas. Além disso, a fase da doença em que o animal se encontra e a sua resposta imunológica influenciam diretamente nesses achados laboratoriais.

Ainda segundo Araújo *et al.*, (2022), a alta incidência dessas enfermidades em determinada região, o histórico do animal com relatos de já ter sido parasitado por carrapatos, e a presença, principalmente, de trombocitopenia no hemograma, direciona comumente as suspeitas clínicas para as hemoparasitoses, mas não são suficientes para um diagnóstico final. No entanto, a ocorrência de redução do número de plaquetas em cães que habitam áreas endêmicas pode atuar como ferramenta viável para orientar novos procedimentos diagnósticos.

4.9 EXAME DIRETO

O exame parasitológico direto é o mais utilizado na rotina das clínicas e hospitais veterinários. No exame parasitológico direto se realiza a pesquisa de formas parasitárias e

consiste na visualização do parasito em lâminas de esfregaço ao microscópio óptico de amostra com suspeita de albergar o parasito. É um método simples, prático, de baixo custo e de alta especificidade, porém, possui baixa sensibilidade, principalmente em estágios de baixa parasitemia. Pode ser realizado por meio de: sangue de ponta de orelha, sangue proveniente de vasos mais calibrosos (jugular, cefálica ou safena) ou de capa leucocitária, extraída do sangue dos vasos calibrosos, sendo essa a de melhor resultado para *Anaplasma platys*. E o esfregaço da capa leucocitária e de sangue proveniente de capilares de ponta de orelha demonstra ser a melhor técnica de exame microscópico direto para visualização de mórulas de *Ehrlichia spp.*, bem como para visualização de *Babesia spp*. e gamontes de *Hepatozoon spp.* (Valente, 2014; Souza, 2021). Souza *and* Ohana, (2022), traz que o método de pesquisa direta por esfregaço sanguíneo obtido por sangue periférico e corado pelo método de Giemsa é o mais utilizado para suspeita de *hepatozoon spp.*. No entanto apresenta baixa sensibilidade principalmente em casos de baixa parasitemia ou parasitemia intermitente, indicando assim o PCR.

Segundo Araújo *et al.*, (2022), quando comparada a outros métodos de diagnóstico, a detecção dos agentes etiológicos pelo esfregaço sanguíneo não é tão efetiva, visto que esses microrganismos são visualizados apenas durante a fase aguda da doença, apresentando, portanto, baixa sensibilidade, principalmente na fase crônica em que a parasitemia é baixa. Além disso, podem ocorrer resultados falso-positivos, já que os patógenos hematológicos podem ser confundidos, na microscopia, com plaquetas, grânulos citoplasmáticos, material nuclear fagocitado e corpúsculos linfo glandulares No entanto, como vantagem os animais positivos são confirmatórios, não sendo necessário a realização de outros exames para fins de diagnóstico (Lima, 2021).

Segundo Lima, (2021), a imunoistoquímica é um método direto que utiliza princípios imunológicos e químicos: anticorpos anti-fração constantes de anticorpos caninos cortados em lâminas histológicas. Com essa técnica é possível aumentar a sensibilidade dos métodos diretos, mas é laborioso e exige amostras de tecido, sendo, portanto, necessário a biópsia. É um método mais útil em pesquisa, pois determina a quantidade de parasitos em amostra de tecidos caninos para fins epidemiológicos.

A cultura consiste no cultivo de uma amostra de tecido canino em laboratórios em condições favoráveis ao parasito. Como por exemplo na *Leishmania*, utiliza-se amostras de órgãos linfoides secundários como baço, fígado e medula óssea. É considerada de baixo custo,

entretanto o resultado pode levar dias, ou seja, tempo necessário para replicação do parasito no cultivo. No entanto, é mais utilizado para fins de pesquisa (Lima, 2021).

4.10 TESTE SOROLÓGICOS

Os testes sorológicos possuem alta sensibilidade, mas podem ocorrer resultados falsos negativos em infecções agudas, apresentarem reações cruzadas e não diferenciarem a pré-exposição ao agente de uma infecção recente, o que reduz a especificidade. Dentre esses estão a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e os testes rápidos, como o teste *SNAP 4Dx Plus* (Araújo, *et al.*, 2023).

De acordo com Araújo *et al.*, (2022) os testes sorológicos ELISA e RIFI são de grande importância clínica, principalmente durante as fases subclínica e crônica da doença, pois a baixa parasitemia dificulta a detecção do agente no exame direto. Eles detectam anticorpos precoces em até sete dias após infecção, no entanto, a maioria dos animais é soropositiva apenas após vinte e oito dias de infecção.

A RIFI é considerada um teste sorológico quantitativo, já que permite a quantificação de altos ou baixos positivos, e possibilita, também, a identificação da fase da doença em que o paciente se encontra por meio da avaliação da cinética dos anticorpos quando realizada em intervalos semanais. Sendo que, mesmo em exame molecular o resultado sendo negativo, a persistência de altos títulos ou valores semelhantes no momento do diagnóstico indica persistência da infecção. A reinfecção é caracterizada pela rápida ascensão de anticorpos (Araújo *et al.*, 2022). Em Lima, (2021), a RIFI já foi descrita como padrão ouro para LVC, tendo como vantagens o baixo custo, a alta sensibilidade, a relativa velocidade do resultado, sendo mais rápida que a cultura, menos laboriosa que a imuno-histoquímica, mais barata que a PCR, mas não tão rápida quanto os testes rápidos. Além disso, pode-se testar sucessivas diluições do soro animal até obter a fluorescência negativa, método conhecido como diluição total, que quantifica indiretamente os anticorpos por exemplo anti-*Leishmania* no soro do animal, sendo divulgado em fração de diluição: 1:40, 1:80, 1:160, sucessivamente. A desvantagem do RIFI é a possibilidade de falsos positivos, já que qualquer anticorpo que se ligar aos diversos antígenos da *Leishmania* aderidos na lâmina podem positivar o teste, mesmo o animal nunca sendo exposto ao parasito, ou seja, ocorrendo a reação cruzada.

O ELISA, é uma sorologia de caráter qualitativa, que é muito utilizada na rotina clínica devido a sua rápida e fácil realização, como por exemplo, o teste rápido Canine Snap 4Dx Plus que é um kit de diagnóstico rápido baseado na metodologia ELISA que detecta anticorpos contra diferentes agentes *(E. canis, Anaplasma spp., Dirofilaria immitis e Borrelia burgdorferi)*. Apesar de serem bastante úteis, o baixo número de anticorpos no início da infecção torna-se um fator desafiador, evidenciando que um resultado negativo neste teste não descarta a possibilidade de um animal estar contaminado (Araújo *et al.*, 2022). Em Lima, (2021), o teste ELISA é tido como método indireto e detecta anticorpos através da reação enzimática lido pelo espectrofotômetro. Os resultados são dados conforme a absorbância observada em placas de ensaio impregnadas com antígeno que se deseja testar, o que permite ter diversas performances de ELISA dependendo do antígeno que o laboratório de diagnóstico utiliza. Possui reação cruzada em teoria menor que o RIFI, seu tempo e custo também é menor, já que podem ser testadas várias amostras em uma mesma placa. Sua desvantagem é que não se recomenda a utilização de absorbância como método quantitativo, pois vários fatores podem alterar esse resultado, além de ser um método que detecta anticorpos e não o antígeno.

Os testes sorológicos apresentam vantagens em relação aos parasitológicos diretos por possibilitarem maior detecção de indivíduos com anticorpos contra os hemoparasitas. No entanto, esses testes não permitem distinguir uma infecção ativa de uma exposição prévia do agente, o que ocasiona resultados falso-positivos. Além disso, apresentam baixa especificidade, em razão das reações cruzadas com outros agentes e da presença de anticorpos de infecções anteriores (Araújo *et al.*, 2022).

Já os testes rápidos, Lima, (2021), descreve que para *Leishmania*, existem diferentes técnicas para detectar anticorpos anti-*Leishmania* e que sua performance varia de acordo com o fabricante, tendo como vantagens o rápido resultado e a facilidade da colheita da amostra, podendo usar somente uma gota de sangue, como o *SNAP 4Dx Plus* por exemplo. Quanto às desvantagens estão a confiabilidade da marca do fabricante, sendo necessário o julgamento do médico veterinário para usar o teste.

4.11 TESTE MOLECULARES

Quanto aos testes moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), esses possuem alta sensibilidade e especificidade, porém, é necessário equipamentos sofisticados e

mão de obra qualificada, o que restringe o uso dessa técnica, além do alto custo (Araújo *et al.*, 2022).

Segundo Araújo *et al.*, (2022), o PCR apresenta maior sensibilidade do que os testes sorológicos, principalmente em infecções agudas, sendo o mais apropriado para a detecção do agente em fases crônicas da doença, além de possibilitar a identificação por espécie ou mesmo subespécie do patógeno envolvido. Outras técnicas foram desenvolvidas com o intuito de maximizar a eficácia da PCR como, por exemplo, a PCR em tempo real (qPCR), que está sendo utilizada com maior frequência para diagnósticos clínicos e experimentos laboratoriais devido a sua capacidade de promover resultados quantitativos. Protocolos de ensaios de PCR convencional, nested-PCR e qPCR têm sido amplamente empregados na detecção e discriminação de hemoparasitos em cães. As principais vantagens da qPCR são sua elevada sensibilidade, especificidade e capacidade de amplificar uma sequência precisa de DNA, possibilitando maior rapidez na tomada de decisões, e menor risco de contaminação, já que o processo de DNA ocorre num sistema fechado. Apesar dos inúmeros benefícios, assim como qualquer outro teste, o exame molecular apresenta suas limitações. Uma delas é a falta de material genético na amostra para a amplificação do DNA do patógeno, ocorrendo o que pode resultar em um falso-negativo e, principalmente, sua acessibilidade, apresentando alto custo, sendo esse método mais comumente utilizado em laboratórios com mais recursos financeiros e técnicos, e nas instituições de pesquisa.

Na ausência da PCR, métodos sorológicos e parasitológicos devem ser utilizados em conjunto para um melhor diagnóstico das hemoparasitoses em cães.

5.0 MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram analisados os dados dos animais que tinham suspeita de hemoparasitoses durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, laudados no laboratório Clínico Veterinário pertencente a Clínica Veterinária Pet Stop, localizada em Unaí MG. Médicos Veterinários da região enviavam diariamente amostras sanguíneas de cães machos e fêmeas, de idades variadas, para realização de hemograma. Geralmente eram cães que iriam passar por algum procedimento cirúrgico, com alterações sugestivas para hemoparasitoses, sem alterações que estavam realizando Check Up (retorno de rotina), sem histórico e sem queixa prévia para hemoparasitoses.

O diagnóstico laboratorial das hemoparasitoses era feito por meio de exames diretos e indiretos para detecção do hemoparasita e/ou anticorpos. Animais que geralmente apresentavam sinais clínicos como: lesões, petéquias e equimoses, apatia, anorexia, hiporexia, caquexia, ascite, alopecia, êmese, hematoquezia, desidratação, alterações neurológicas, paralisia parcial de membros, AHIM (Anemia Hemolítica Imunomediada), cistite, entre outros, eram solicitados exames para hemoparasitoses.

Animais com suspeita de hemoparasitoses como Ehrlichioses, Anaplasmoses, realizavam o *SNAP 4Dx Plus IDEXX Laboratories®*, que é um teste rápido de diagnóstico *in vitro* para a detecção do antígeno de *Dirofilaria immitis* e dos anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii* em soro, plasma ou sangue total caninos. Esse teste possui sensibilidade de 97,1% e especificidade de 95,3%, para o gênero *Ehrlichia* (*E. canis e E. ewingii*) e de 90,3% e 94,3% para o gênero *Anaplasma* (*A. platys e A. phagocytophilum*), respectivamente, de acordo com a informação do fabricante.

Os métodos indiretos realizados para detecção de leishmaniose são os métodos sorológicos ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) e o RIFI D.T. (Reação de Imunofluorescência Indireta Diluição Total) e são realizados pelo Laboratório Hermes Pardini, laboratório particular da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Amostras de sangue total de cão com suspeita de Leishmaniose eram coletadas pelos médicos veterinários da região em tubo de coleta com ativador de coágulo e enviadas ao laboratório com solicitação pelo método sorológico. No laboratório essas amostras eram identificadas para controle, centrifugadas e o

soro separado em outro tubo e identificado com etiqueta do laboratório Hermes Pardini. As amostras geralmente são enviadas no mesmo dia, exceto no feriado e final de semana, e todo dia um representante do laboratório particular situado na Cidade de Belo Horizonte, MG, recolhe essas amostras. No dia de envio, as amostras são cadastradas no próprio site do laboratório Hermes Pardini com o número da etiqueta do tubo com a amostra. As respostas do Laudo são dadas como Reagente, quando animais possuem anticorpos para o antígeno e Não-Reagente quando não possui ou indeterminado quando o resultado é inconclusivo. O RIFI D.T quando reagente é informado também a proporção de diluições realizadas (p. ex., 1:40, 1:80). Já o ELISA detecta anticorpos anti-leishmania no plasma sanguíneo.

O método direto é pelo esfregaço sanguíneo que consiste em utilizar uma gota de sangue em uma lâmina, e após a secagem da lâmina é realizada a coloração com panótico rápido para contagem e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e pesquisa de hemoparasitas, como *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Hepatozoon spp.* e *Leishmania spp.*.

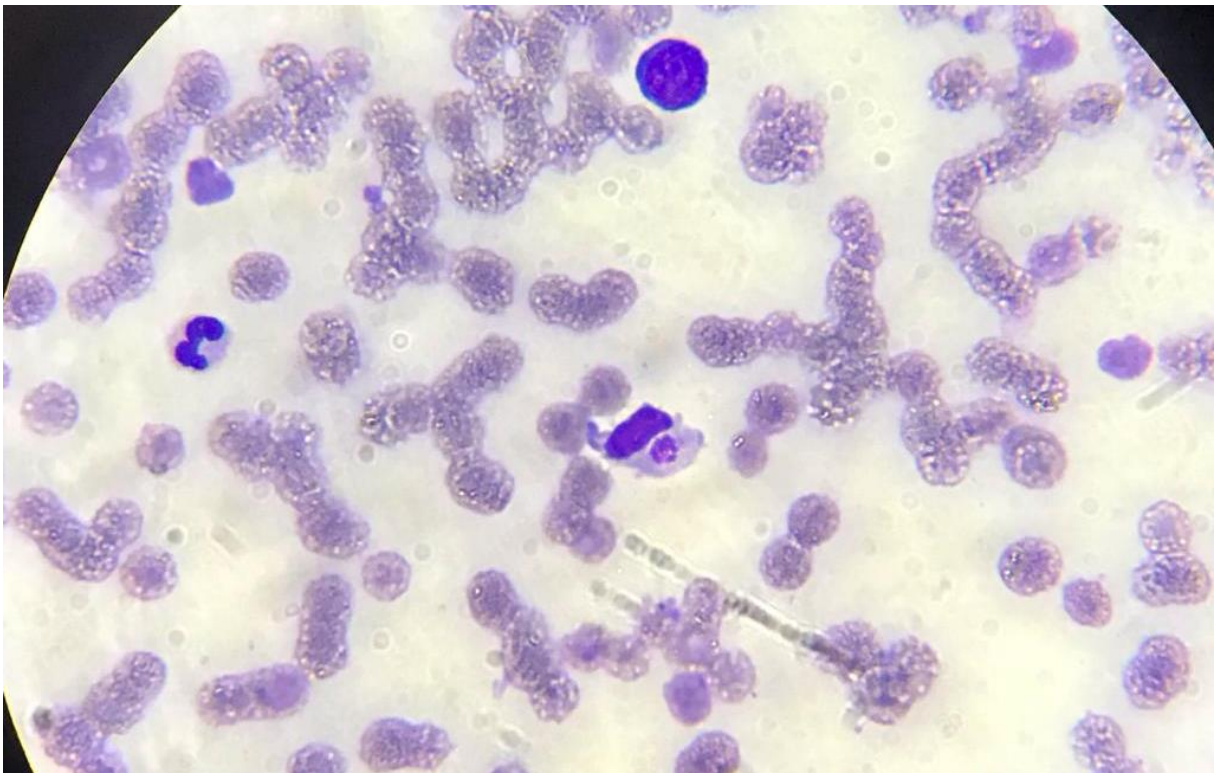
Para confirmação de casos de suspeita de hemoparasitoses foram analisados os resultados dos exames diretos e indiretos para hemoparasitoses realizados durante o ano de 2022.

6.0 RESULTADOS

6.1 EHRLICHIOSE, ANAPLASMOSE, BABESIOSE E HEPATOZOONOSE

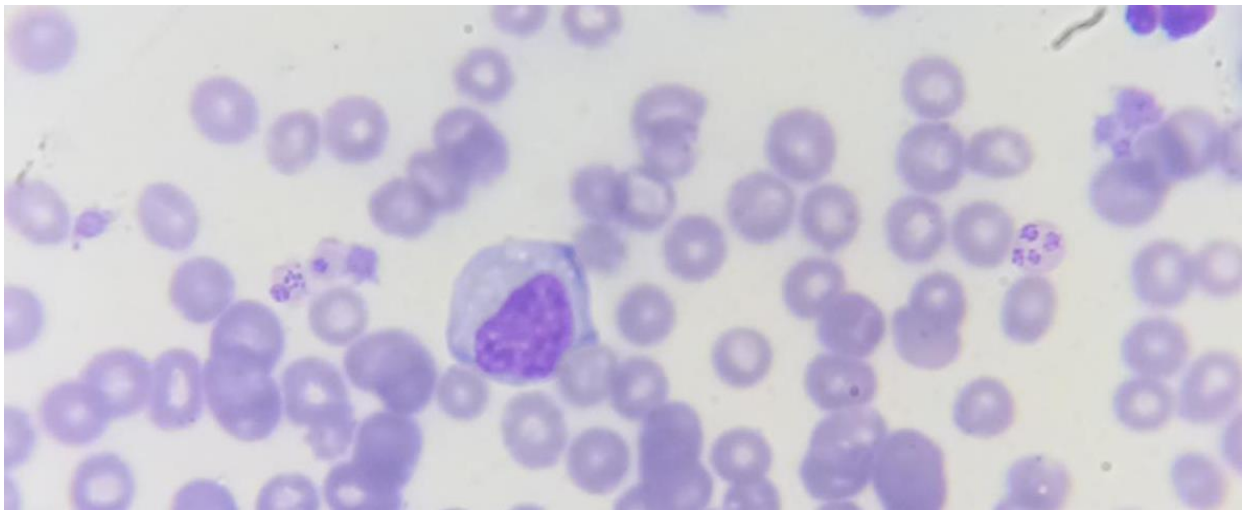
Para diagnóstico das Hemoparasitoses, Ehrlichiose, Anaplasmose, Babesiose e Hepatozoonose foram realizados 219 testes rápidos *SNAP 4Dx Plus* e todos passaram pela Pesquisa Direta em esfregaço de sangue total, algumas amostras foram provenientes de medula óssea, e ponta de orelha, e todas as amostras dos cães foram encaminhados para o laboratório Clínico. Dos 219 *SNAP 4Dx Plus* realizados, 89 foram positivos, representando 41% dos testes realizados, e 44 foram positivos pelo método direto representando aproximadamente 33% dos cães positivos, totalizando 133 cães positivos. Na Pesquisa Direta todos os cães que realizaram o teste *SNAP 4Dx Plus* fizeram, também, hemograma e leitura do esfregaço sanguíneo. No entanto, apenas 44 cães apresentaram inclusões celulares sugestivas de hemoparasitas na lâmina, onde apenas um cão foi positivo em ambos os métodos de diagnósticos. No entanto nessa pesquisa não foi encontrado inclusões citoplásmicas sugestivas de *Hepatozoon spp*. em pesquisa direta por esfregaço sanguíneo.

O *SNAP 4Dx Plus* foi testado na maior parte do ano, representando 83% aprox. dos métodos utilizados, ou seja, em 10 meses foi o teste mais realizado. A pesquisa direta foi a mais utilizada em apenas 2 meses. No entanto, pode-se observar que para os casos de Anaplasmose e Babesiose, o método mais realizado foi a pesquisa direta mas que para Hepatozoonoses não houveram cães positivos, e que para a Erliquiose, o *SNAP 4Dx Plus* foi o método mais realizado.



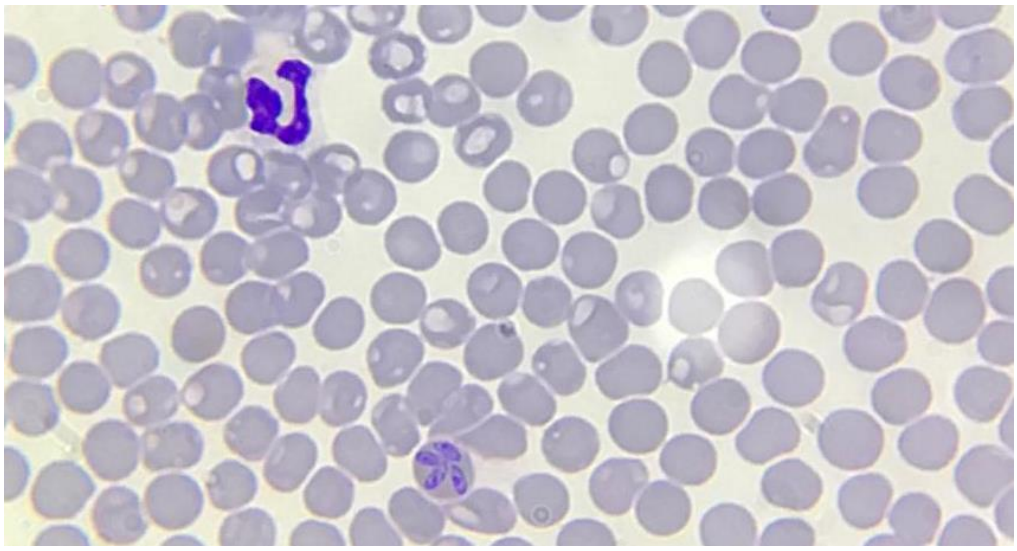
Fonte: Laura Magalhães.

Figura 1. Visualização sugestiva de *Ehrlichia spp.* dentro de células mononucleadas observada em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.



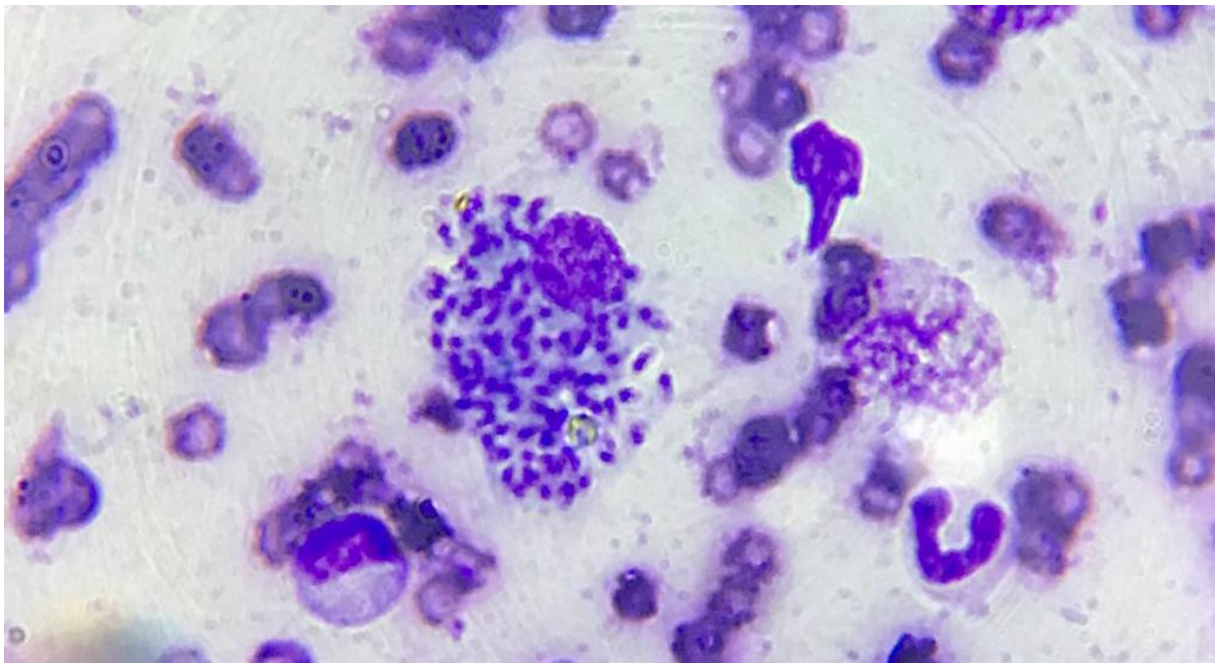
Fonte: Laura Magalhães.

Figura 2. Visualização sugestiva de *Anaplasma spp.* dentro de plaquetas observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.



Fonte: Laura Magalhães

Figura 3. Visualização sugestiva de *Babesia spp*. dentro de hemácias observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.



Fonte: Laura Magalhães.

Figura 4. Visualização sugestiva de *Leishmania spp.* dentro de células mononucleadas observadas em esfregaço sanguíneo de cão. Clínica Pet Stop, Unaí MG, 2022.

Foram identificadas 24 raças de cães positivos para essas hemoparasitoses, onde os cães SRD representavam 37% dos casos positivos, seguido pelo Shih tzu com 20%, assim como representado pelo gráfico abaixo:

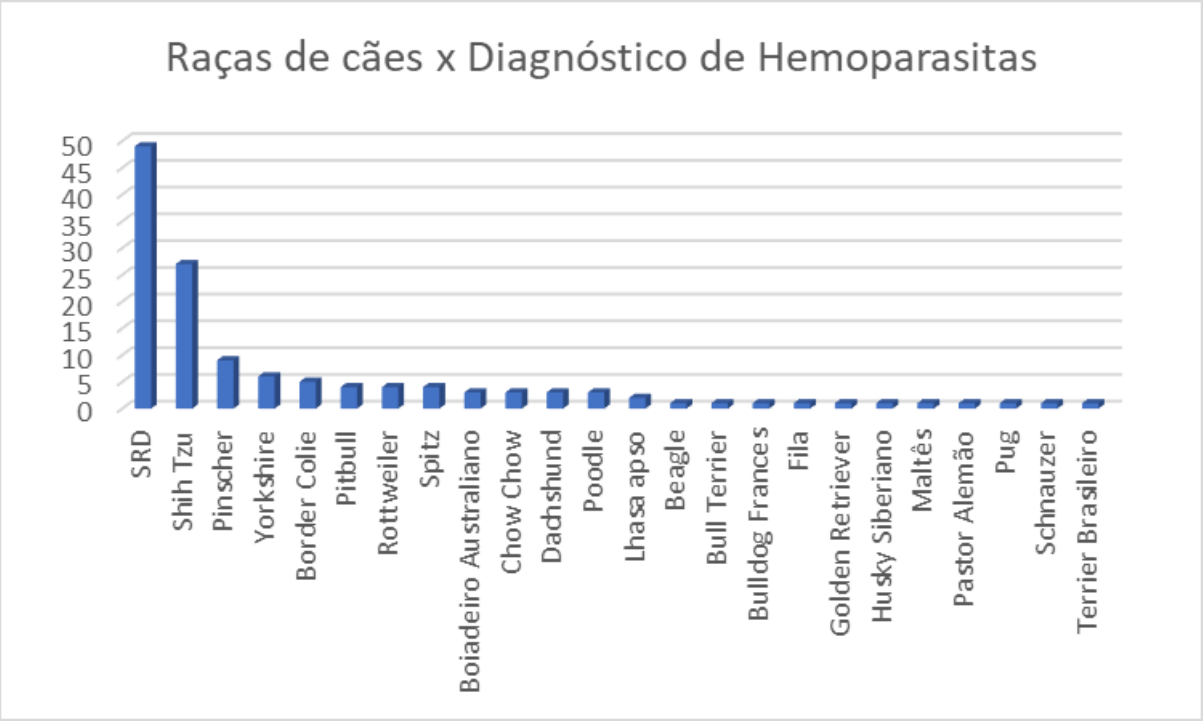


Gráfico 1. Principais raças de cães positivos para os hemoparasitas *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Babesia* da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.

Quanto à raça dos cães positivos, Shih tzu esteve presente em todas as hemoparasitoses encontradas até as encontradas em conjunto, como no caso da Anaplasmose e Ehrlichiose, que teve 14 cães positivos, e Anaplasmose e Babesiose que foi um único caso. O SRD foi o que mais positivou no total, seguido do Shih tzu.

Quanto ao sexo dos 133 cães positivos, aproximadamente 57% eram fêmeas, e aproximadamente 43% eram machos. As fêmeas foram em maior quantidade positivas para as hemoparasitoses em 8 meses do ano, sendo prevalente em: fevereiro, abril, maio, junho, julho, outubro, novembro e dezembro. Já os machos apenas em 3 meses, prevalecendo em março,

agosto e setembro, e em apenas um mês ambos os sexos foram iguais, sendo esse o mês de janeiro.

Quanto à idade no geral, 31 cães tinham de 0 a 12 meses; 9 cães tinham acima de 12 meses até 24 meses (2 anos); 38 cães tinham mais de 24 meses até 60 meses, respectivamente de 2 a 5 anos; e 54 cães tinham idade acima de 60 meses (5 anos). Apenas 1 cão não foi informado a idade.

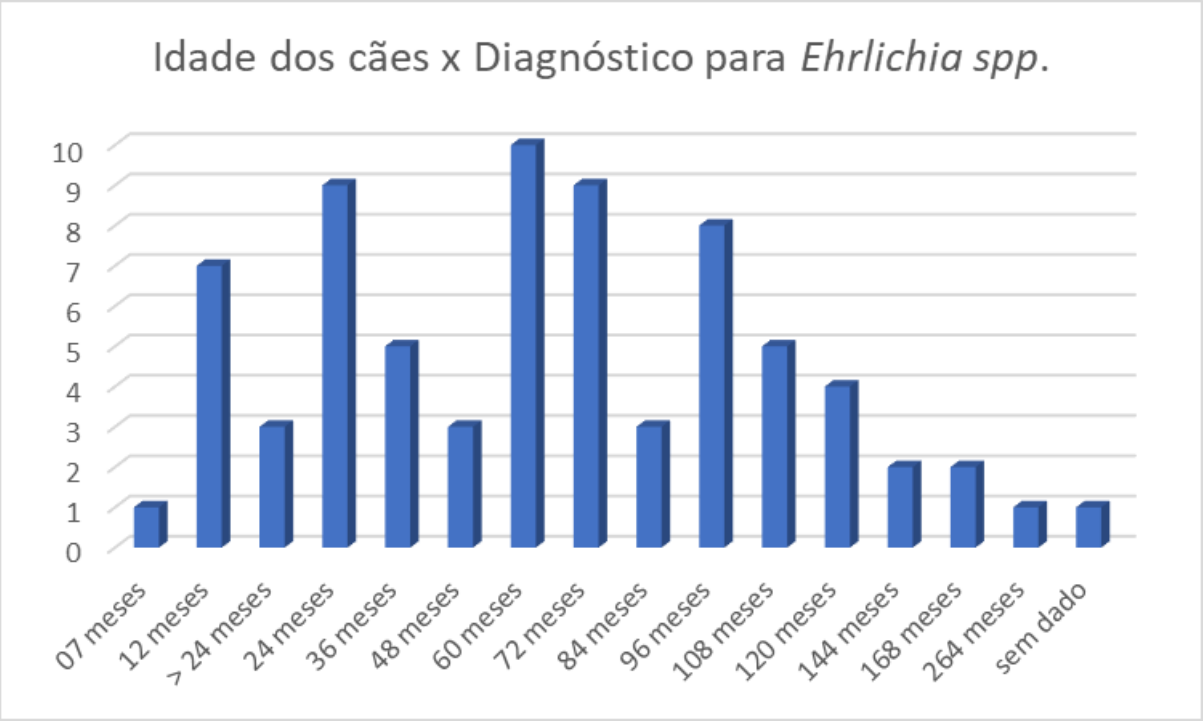


Gráfico 2. Idade dos cães com Ehrlichiose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.

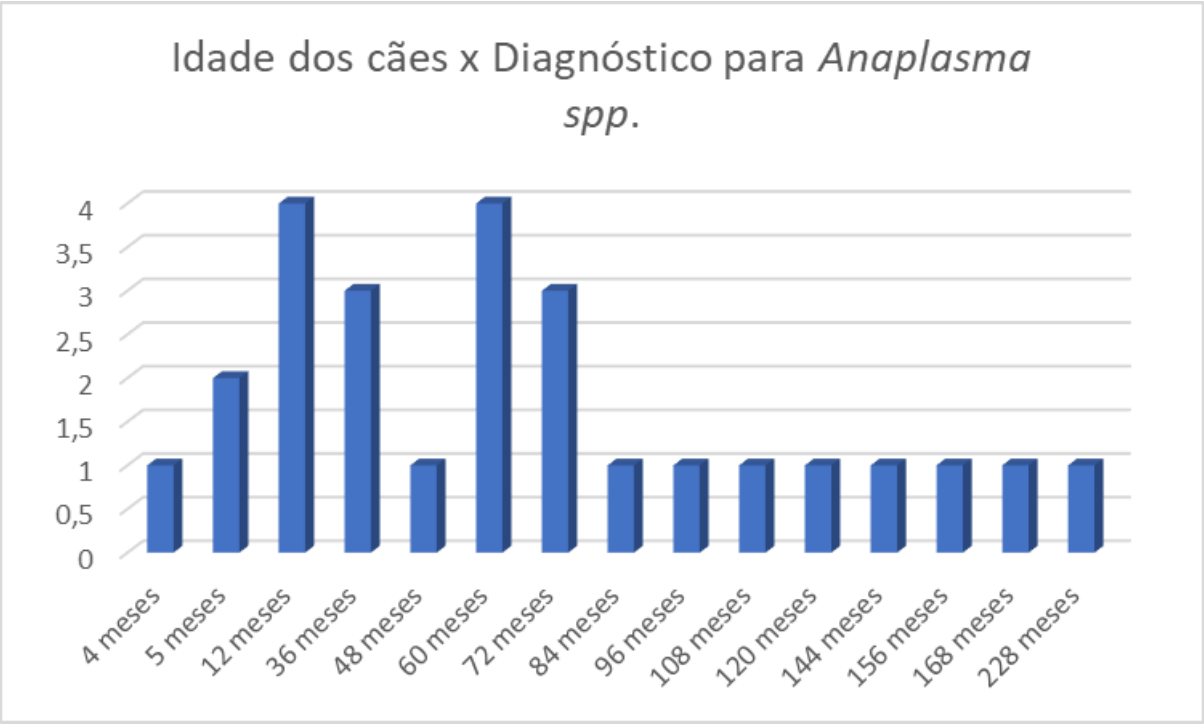


Gráfico 3. Idade dos cães com Anaplasmose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.

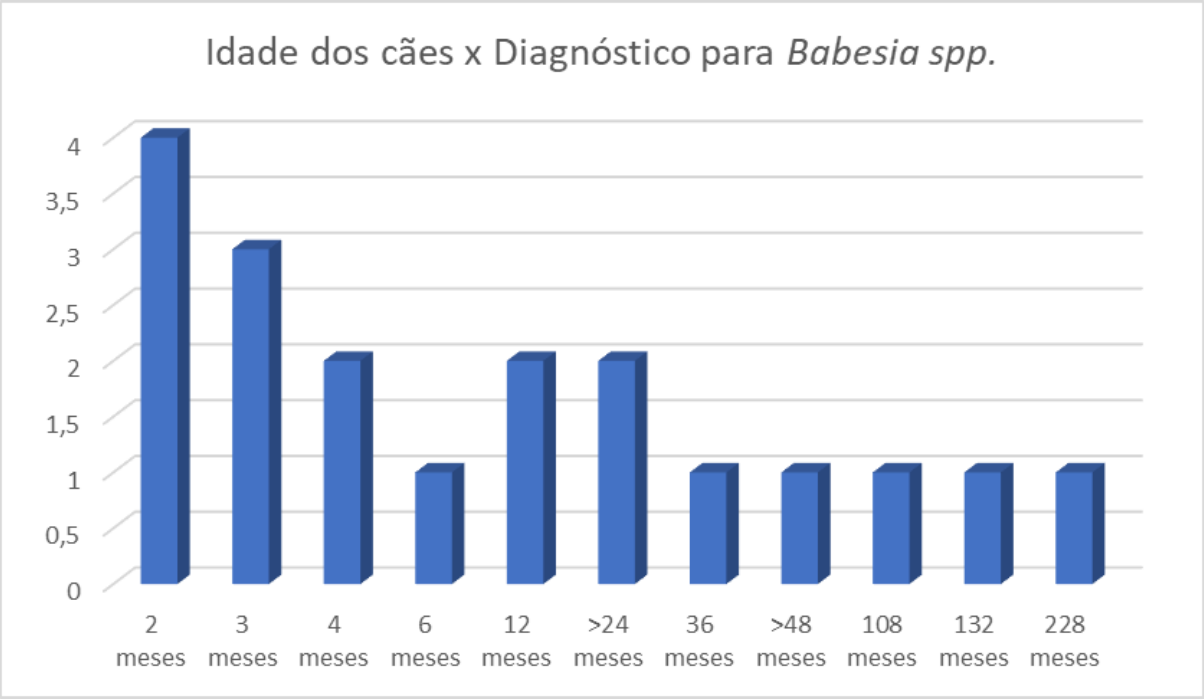


Gráfico 4. Idade dos cães com Babesiose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos para as principais hemoparasitoses encontradas, entretanto, para Babesiose foi realizado somente o método direto em esfregaço sanguíneo.

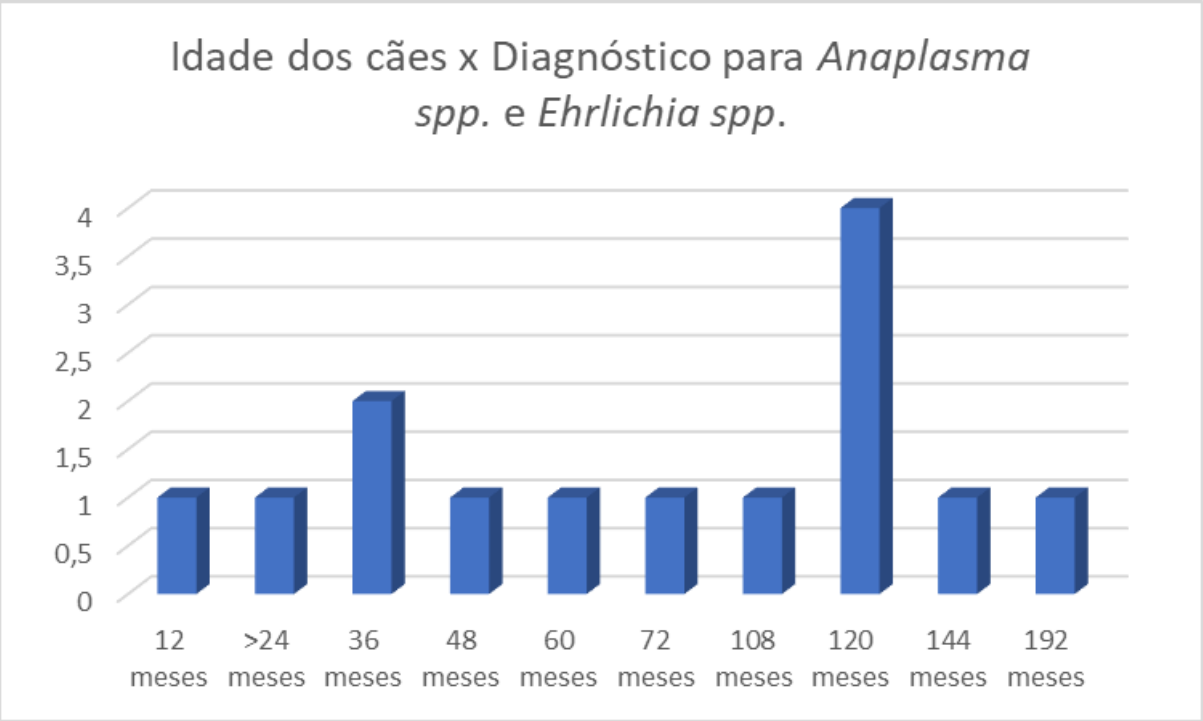


Gráfico 5. Idade dos cães com Anaplasmose e Ehrlichiose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 133 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto *SNAP 4Dx Plus* e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.

A hemoparasitose mais encontrada foi a Ehrlichiose, estando predominantes em 9 meses do ano, mês de janeiro, fevereiro, março, abril, maio, agosto, setembro, outubro e novembro, representando aproximadamente 65% das hemoparasitoses encontradas, ou seja, 87 cães foram positivos para essa doença, sendo que o método de diagnostico mais utilizado o *SNAP 4Dx* Plus. Entretanto, aproximadamente 16% desses animais, ou seja, 14 cães, foram positivos também para Anaplasmose.

Já a Anaplasmose foi a segunda hemoparasitose mais encontrada, com aproximadamente 31% dos cães positivos, ou seja, 41 cães apresentaram a doença e em 2 meses (junho e julho), foi a mais encontrada. Entretanto, 37% desses cães positivos para Anaplasmose também foram positivos para outros hemoparasitos. Desses, 14 cães foram positivos para Anaplasmose e Ehrlichiose, e apenas um cão foi positivo para Anaplasmose e Babesiose.

A Babesiose foi encontrada em aproximadamente 15%, ou seja, 20 dos cães positivos, e somente em um mês prevaleceu como a hemoparasitose mais encontrada. No entanto, em um cão foi encontrada também a Anaplasmose associada.

Correlação das principais Hemoparasitoses encontradas em cada mês do ano de 2022:

No mês de janeiro 14 cães foram positivos em pesquisa direta pelo esfregaço sangue total e no *SNAP 4Dx Plus*. Relacionado ao sexo 50% eram fêmeas (7), 50% eram machos (7). Quanto ao parasita mais encontrado, em 85,7% dos casos, ou seja, 12 cães foram positivos para Ehrlichiose e o método de diagnóstico utilizado em 100% desses casos foi o *SNAP 4Dx Plus*. Entretanto, desses 12 cães com Ehrlichiose, 3 cães foram positivos também para Anaplasmose. Somente 1 dos 14 cães, foi positivo para Babesiose e somente 1 para apenas Anaplasmose. No entanto, o método de diagnóstico para detecção da Babesiose e Anaplasmose nos cães foi o método direto, pelo esfregaço sanguíneo. E as Anaplasmose associadas com a Ehrlichiose foram positivas somente no teste rápido *SNAP 4Dx Plus*, não sendo encontradas em esfregaço sanguíneo.

No mês de fevereiro foram positivos 11 cães para as hemoparasitoses. Sendo que, 5 eram machos, representando 45% e 6 eram fêmeas, representando 55%. Quanto ao parasita encontrado, 8 desses cães foram positivos para Ehrlichiose, representando aproximadamente 73% das amostras, 2 para Anaplasmose, representando aprox. 18% e 1 para Babesiose, representando aprox. 9%. Quanto ao método de diagnóstico realizado o *SNAP 4Dx Plus* foi utilizado em 100% das Ehrlichiose diagnosticadas. Para a Anaplasmose, 1 cão foi positivo e 1 negativo no *SNAP 4Dx Plus*. Entretanto, esse mesmo cão negativo pelo *SNAP 4Dx Plus* para Anaplasmose, foi positivo em lâmina pela pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. O único caso de Babesiose encontrada foi diagnosticado pelo método direto em esfregaço sanguíneo.

No mês de março foram positivos 14 cães, todos realizaram o teste *SNAP 4Dx Plus*. Desses 14 cães, 9 eram machos e 5 eram fêmeas, representando respectivamente aprox. 64% e 36%. Quanto a hemoparasitoses mais encontradas, 13 foram Ehrlichiose, representando 93% dos casos, e 1 apresentou apenas Anaplasmose, entretanto, 1 dos cães que apresentou Ehrlichiose também apresentou Anaplasmose associada. Quanto aos métodos de diagnóstico, 100% das hemoparasitoses foram diagnosticadas pelo *SNAP 4Dx Plus*, este considerado um teste rápido e sorológico.

No mês de abril 9 cães foram positivos para as hemoparasitoses. Desses, 8 cães eram fêmeas e 1 era macho, representando 89% e 11% respectivamente. A hemoparasitose mais encontrada foi a Ehrlichiose, representando cerca de 89% com 8 diagnósticos positivos e 1 positivo somente para Anaplasmose, representando 11% dos diagnósticos. O método de diagnóstico realizado foi o *SNAP 4Dx Plus* em 100% das hemoparasitoses encontradas.

No mês de maio, apenas 1 cão foi positivo para hemoparasitoses. Esse era fêmea, e o método de diagnóstico realizado foi o *SNAP 4Dx Plus*. A hemoparasitose encontrada foi a Erlichiose.

No mês de junho, 20 cães foram positivos para hemoparasitoses. Dessas, 60% eram fêmeas, (12 cães) e 40% machos (8 cães). A hemoparasitose mais encontrada foi a Anaplasmose, com 45% de cães positivos, seguida da Ehrlichiose com 35%, e fechando com Babesiose com 25% dos cães. Os métodos de diagnóstico utilizados foram o *SNAP 4Dx Plus* e a pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. Das Anaplasmoses positivas neste estudo, apenas 3 realizaram o teste *SNAP 4Dx Plus*, resultando em 2 cães positivos no teste e 1 negativo. Entretanto, este último resultou em positivo na pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. Complementando, 2 cães que apresentaram Anaplasmose apresentaram também outras hemoparasitoses associadas, sendo 1 caso com Babesiose, e negativo no *SNAP 4Dx Plus* para ambas hemoparasitoses, mas, encontradas no método direto pelo esfregaço sanguíneo. E 1 caso com Ehrlichiose, na qual o *SNAP 4Dx Plus* foi positivo para ambas hemoparasitoses, mas somente *Anaplasma* foi encontrada em esfregaço sanguíneo. O método de diagnóstico utilizado para detectar a Ehrlichiose foi o *SNAP 4Dx Plus* em 100% dos casos. Todos os casos de Babesioses diagnosticados foram detectados pela pesquisa direta em esfregaço sanguíneo.

No mês de julho, apenas 3 cães foram positivos, sendo 2 fêmeas, representando aprox. 67% e apenas 1 macho, aprox. 33%. A hemoparasitose encontrada foi a Anaplasmose em 100% dos cães avaliados. E os métodos de diagnóstico realizados para detecção foi o de pesquisa direta pelo esfregaço sanguíneo. Foi realizado o teste rápido, *SNAP 4Dx Plus* em 1 animal, mas resultou em negativo, entretanto, positivo na pesquisa direta em esfregaço sanguíneo.

No mês de agosto, 15 cães foram positivos. Desses, 8 eram machos, ou seja, aprox. 53%, e 7 eram fêmeas, aproximadamente 47% dos cães. Das hemoparasitoses detectadas, 11 representam aprox. 73% de Ehrlichiose, essas também associadas com outras hemoparasitoses, como a Anaplasmose em 27% aprox. dos casos, ou seja, 3 animais foram positivos para Ehrlichiose e Anaplasmose pelo *SNAP 4Dx Plus* e os outros 8 animais, 73% aprox. eram positivos somente para Erlichiose. O método de diagnóstico *SNAP 4Dx Plus* foi utilizado para 91% dos casos de Ehrlichiose. Em contrapartida, no esfregaço sanguíneo somente 1 cão apresentou a presença de *Ehrlichia spp,* mas não foi realizado outro método de diagnóstico. Quando em conjunto com Ehrlichiose, a Anaplasmose foi positiva em 3 testes do *SNAP 4Dx Plus*. Entretanto, não foram encontradas em esfregaço sanguíneo. E quando separada, ou seja, somente Anaplasmose, essa foi diagnosticada pela pesquisa direta em esfregaço sanguíneo resultando em 4 cães positivos pelo método, o que se pode observar que nem sempre que o *SNAP 4Dx Plus* é positivo é encontrado o parasita em esfregaço sanguíneo.

No mês de setembro 11 cães foram positivos, e os métodos de diagnósticos foram o *SNAP 4Dx Plus* e a pesquisa direta em sangue total. Destes, 5 eram fêmeas e 6 eram machos, ou seja, aprox. 45% e aprox. 55% dos cães positivos. Sobre as hemoparasitoses encontradas, 8 apresentaram positivos para Ehrlichioses,ou seja, aprox. 73%, sendo 100% testadas pelo *SNAP 4Dx Plus*. E 5 cães foi positivo Anaplasmose, representando, 45% dos cães, entretanto, 3 desses animais (60%) possuíam outro hemoparasita associado, que no caso foi a *Ehrlichia spp.,* e 2 animais, (40%), apresentaram somente a Anaplasmose. O *SNAP 4Dx Plus* foi o método de diagnóstico usado em 10 dos cães, representando 91% dos métodos de diagnóstico neste mês, resultando positivo em 9 cães e negativo em 1. No entanto, esse 1 cão negativo foi testado pelo método direto em esfregaço de sangue e foi positivo para Anaplasmose. Quanto ao esfregaço direto, esse foi positivo em 2 animais, ambos para Anaplasmose, sendo que 1 foi negativo no *SNAP 4Dx Plus* mas positivo em lâmina e o outro foi testado somente em lâmina.

No mês de outubro 9 cães foram positivos para hemoparasitoses. Destes, 5 eram fêmeas e 4 eram machos, representando, aproximadamente, 56% e aprox. 44%. A hemoparasitose mais encontrada foi a Ehrlichiose, representando aprox. 78%, 7 casos, seguida pela Anaplasmose com 22%, 2 casos, sendo que 1 caso estava associado a outro hemoparasita, no caso a *Ehrlichia spp*. Para a Babesiose, somente 1 cão foi positivo, representando 11% das hemoparasitoses encontradas. Em 6 casos, 67% aprox. foi realizado o teste rápido *SNAP 4Dx Plus*, e 3 casos, 33%, foram positivos pelo método direto em esfregaço sanguíneo. Nessa pesquisa direta, foram encontradas 1 caso de Babesiose, 1 de Ehrlichiose e 1 de Anaplasmose. E a Anaplasmose associada a Ehrlichiose foi positiva no *SNAP 4Dx Plus*, mas não foi encontrada na lâmina.

No mês de novembro foram positivos 11 cães em pesquisa direta em sangue total e *SNAP 4Dx Plus*. Destes, 9 eram fêmeas, representando, aproximadamente, 82% dos cães positivos, e 2 eram machos, representando, aproximadamente, 18% desses cães. As hemoparasitoses encontradas foram, Ehrlichiose, aprox. 55%, 6 cães, Babesiose, aprox. 45%, 5 cães. No entanto, Anaplasmose foi encontrada em conjunto com Ehrlichiose em 2 casos. O *SNAP 4Dx Plus* foi o método utilizado em 55% aprox., com 6 cães testados. E o esfregaço sanguíneo foi positivo em 45% aproximadamente em 5 cães. Pelo método de *SNAP 4Dx Plus* foram positivos tanto para Ehrlichiose quanto para Anaplasmose em alguns casos, mas não foi observado nada no esfregaço sanguíneo. Já o esfregaço sanguíneo diagnosticou 100% dos casos de Babesioses, entretanto esses não foram testados pelo *SNAP 4Dx Plus.*

No mês de dezembro 15 cães foram positivos em esfregaço sanguíneo em sangue total e no *SNAP 4Dx Plus.* Destes, 9 eram fêmeas, 60% dos cães, e 6 eram machos, 40%. As hemoparasitoses encontradas foram, 33% aprox. (5 cães) Ehrlichiose, 27% aprox. Anaplasmose (4 cães), e 40% (6 cães) Babesiose. Não foram encontradas hemoparasitas associadas. E o método de diagnóstico utilizado foi o *SNAP 4Dx Plus* em 33% dos cães positivos nesse mês, os outros 67% aprox. foram positivos em pesquisa direta pelo esfregaço sanguíneo. Sendo que, a Ehrlichiose foi encontrada em 100% pelo *SNAP 4Dx Plus*, e a Babesiose e Anaplasmose foram encontradas pelo método direto, 60% (6 cães) positivos para *babesia spp*. e 40% (4 cães) positivos para *Anaplasma spp*.

6.2 LEISHMANIOSE

Para pesquisa em leishmaniose foram realizados testes sorológicos, ELISA, RIFI D.T, diagnóstico Direto pelo esfregaço sanguíneo e Imunocromatológico.

Foram realizados 173 exames no período de janeiro a dezembro do ano de 2022 para diagnóstico da Leishmaniose. Dos métodos de diagnóstico realizados, o ELISA foi realizado em 90 cães, desses 21 foram positivos, 62 negativos e 7 indeterminados. O RIFI D.T foi o segundo método mais utilizado com 75 exames realizados, resultando em 20 cães positivos e 55 negativos. O método Direto pelo esfregaço sanguíneo foi realizado em 6 cães, sendo 2 cães positivos e 4 negativos. E o método Imunocromatográfico foi realizado em 2 cães e ambos foram negativos.

Os resultados positivos e indeterminados resultaram em 50 cães, onde 48% eram fêmeas e 44% machos, representando, 24 e 22 cães respectivamente. Entretanto, 4 cães não foi descrito qual era o sexo. Dos 50 cães, 43 cães foram positivos e 7 indeterminados, ou seja, 86% dos cães eram positivos para Leishmaniose e 14% era inconclusivo para a doença.

Quanto a idade dos cães estes estão representados no gráfico abaixo: 10 cães tinham 5 anos, destes 3 foram inconclusivos e 7 positivos; 7 cães tinham 6 anos, todos positivos; 7 cães tinham 2 anos, com 1 cão inconclusivo; 6 cães tinham 4 anos e 1 cão era inconclusivo; 5 cães tinham 8 anos e 1 era inconclusivo; 3 cães tinham 3 anos e todos positivos; 3 cães tinham 1 ano e todos eram positivos; 2 cães tinham 8 meses e ambos positivos; e as demais idades era representado somente por 1 cão positivo.

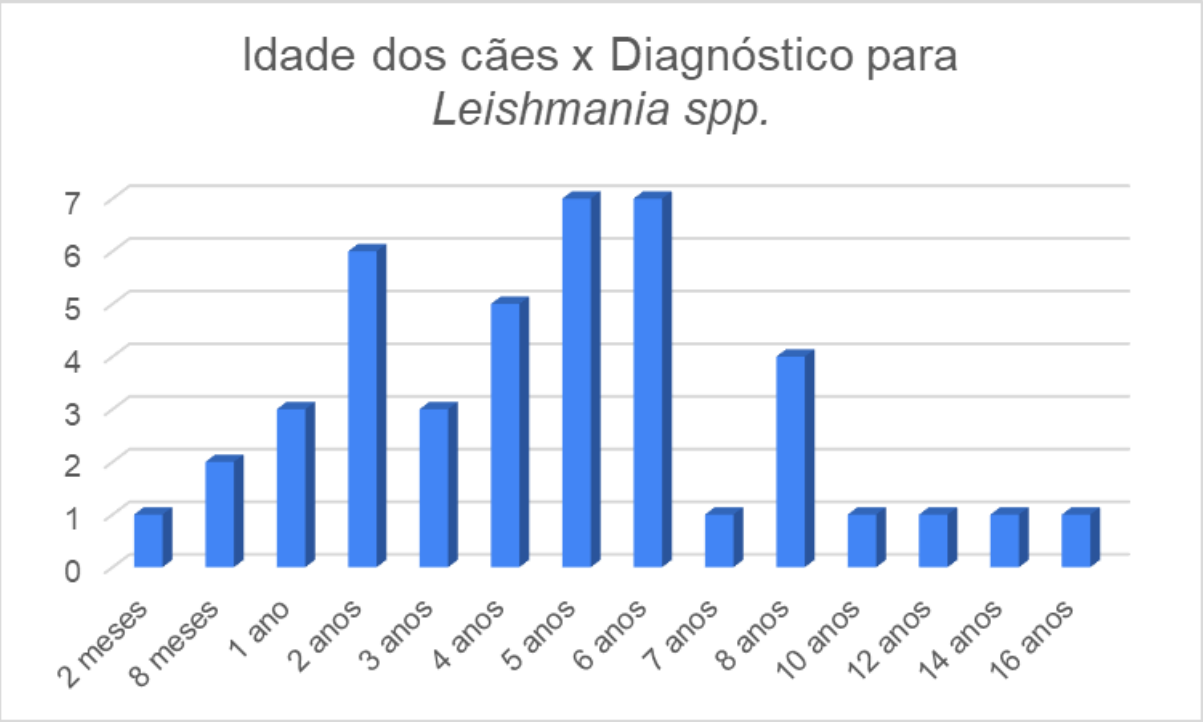


Gráfico 6. Idade de cães positivos para Leishmaniose da região Noroeste de Minas Gerais durante o ano de 2022, diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 43 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto ELISA, RIFI D.T, e pelo método direto em esfregaço sanguíneo. Os cães apresentavam idades que variam entre 2 meses a 16 anos.

O gráfico abaixo demonstra o número de cães positivos durante os meses do ano de 2022. Os meses de março, maio e novembro foram os meses com maiores casos de cães positivos, seguidos por dezembro, janeiro, fevereiro, abril, junho, julho, outubro, agosto e setembro respectivamente.

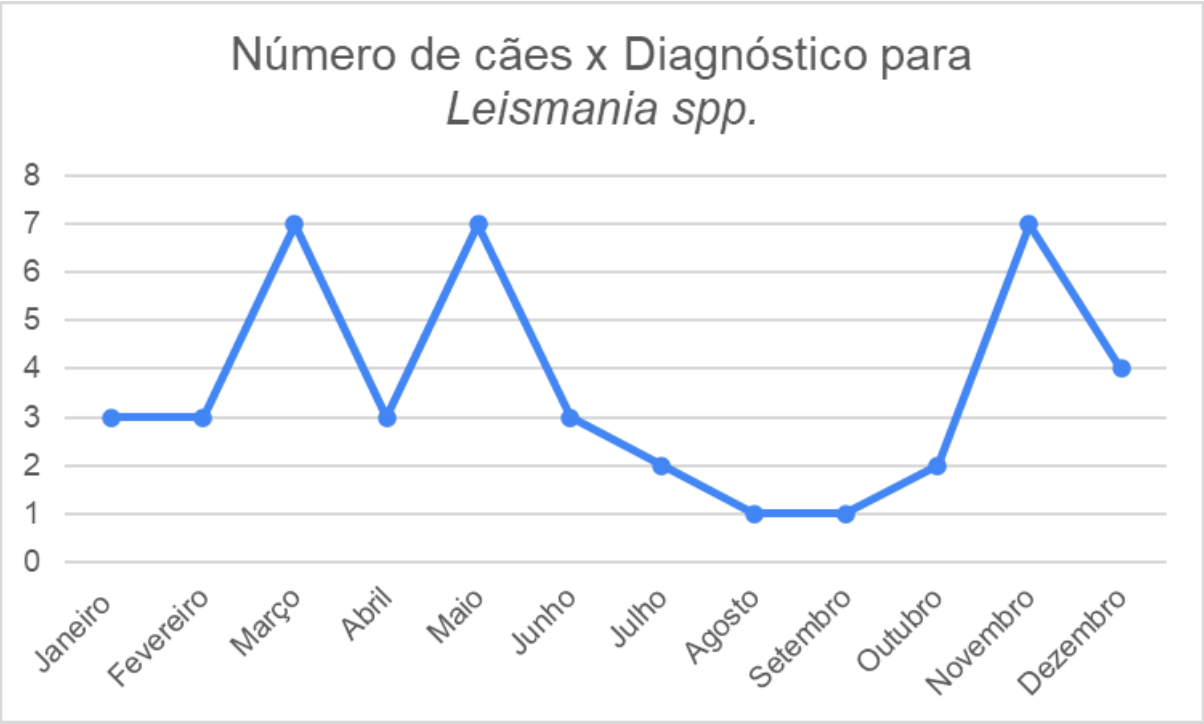


Gráfico 7. Número de cães positivos para Leishmaniose da região Noroeste de Minas Gerais durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2022 diagnosticados pelo laboratório Clínico da Pet Stop localizado na cidade de Unaí, Minas Gerais. Foram avaliados 43 cães positivos pelos métodos de diagnóstico indireto ELISA, RIFI D.T, e pelo método direto em esfregaço sanguíneo.

Quanto aos métodos de diagnósticos utilizados, o ELISA foi o método de diagnóstico que mais resultou em animais reagentes, sendo 56% dos cães positivos testados por esse método (28 cães). No entanto, 7 animais, ou seja, 25% dos testados com ELISA resultaram como indeterminados. Para o RIFI D.T, 40% dos animais, (20 cães), foram reagentes. E na pesquisa direta pelo esfregaço sanguíneo, somente 4% foi positivo para *Leishmania spp.* (2 cães). Em um caso específico um animal foi testado para o RIFI D.T e ELISA, no entanto, resultou negativo para o RIFI D.T e reagente para o ELISA.

Nos meses de janeiro, fevereiro, abril, maio, junho, julho e setembro o ELISA foi o método mais utilizado. Entretanto, em agosto e dezembro o ELISA não foi positivo. Nos meses de março, novembro e dezembro o RIFI foi o mais utilizado. Entretanto, junho, julho e setembro o RIFI não foi positivo em nenhum caso. E somente nos meses de março e dezembro o método de diagnóstico direto foi positivo.

7.0 DISCUSSÃO

7.1 DISCUSSÃO: EHRLICHIOSE, ANAPLASMOSE, BABESIOSE E HEPATOZOONOSE

O diagnóstico das hemoparasitoses de animais de companhia é um desafio, pois essas enfermidades apresentam sintomatologia semelhante e, por serem de transmissão vetorial, os animais podem estar infectados por mais de um agente de forma simultânea, principalmente em regiões endêmicas. Assim, como ocorrido neste estudo em que se encontrou *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* simultaneamente no mesmo animal.

De acordo com Araújo *et al.*, (2022), os hemoparasitas podem ser transmitidos pelo carrapato e afetarem principalmente as células sanguíneas de seus hospedeiros. No entanto, algumas características estão associadas aos vetores, como por exemplo o *Rhipicephalus sanguineus*, que necessita de fatores ecológicos e climáticos para sua disseminação e dos agentes causadores de doenças transmitidas. Condições climáticas de temperaturas mais elevadas proporcionam um ambiente propício ao ciclo desse vetor, o que o torna comum encontrar maiores quantidades nesse ambiente, portanto, maiores chances de disseminação. Assim, justificando por exemplo a cidade de Unaí, Minas Gerais, local da análise desse estudo, ser considerada endêmica para essas hemoparasitoses, pois de acordo com Silva *and* Jardim, (2019), é uma região que corresponde ao tipo de clima Tropical Quente Semi Úmido, onde 04 a 05 meses do ano são secos, com período de maiores temperaturas e totais pluviométricos ao longo da primavera/verão.

Assim, como demonstrado neste trabalho com 133 cães positivos, podendo sugerir uma frequente presença do vetor na região de estudo. Para Leal, (2015), encontrar *Anaplasma spp.*, *Babesia spp. e Ehrlichia spp.* são sugestivos do acometimento do vetor *Rhipicephalus sanguineus*, pois este tem capacidade de ser transmissor dos diferentes agentes etiológicos simultaneamente.

Neste estudo o método mais utilizado para detecção da Ehrlichiose foi o ELISA rápido *SNAP 4Dx Plus*, sendo positivo em 41% (89) dos testes realizados, e representando como a hemoparasitose mais encontrada no ano de 2022 com 65% aproximadamente dos cães positivos quando comparada a Anaplasmose e Babesiose. Além disso, o *SNAP 4Dx Plus* foi o mais testado neste estudo, representando cerca de 83% dos métodos utilizados, sendo o mais

empregado. Na Pesquisa Direta todos os cães que realizaram o teste *SNAP 4Dx Plus* fizeram, também, hemograma e leitura do esfregaço sanguíneo. No entanto, apenas 44 cães apresentaram inclusões celulares sugestivas de hemoparasitas na lâmina, onde apenas um cão foi positivo em ambos os métodos de diagnósticos. E não foram encontradas inclusões sugestivas de *Hepatozoon spp.* em esfregaço sanguíneo na pesquisa direta.

Entretanto, Lima (2021) denota que os testes rápidos são recomendados, mas animais tratados e curados podem permanecer positivos por meses, o que pode resultar em um falso positivo. Como descrito na Anaplasmose, foram encontrados 14 cães positivos para Ehrlichiose e Anaplasmose co-infectados, representando 16% das Ehrlichioses encontradas. Quando sozinha, a *Ehrlichia* spp. prevaleceu em maior número em cães com idade de 5 anos, seguido por 6 e 2 anos, respectivamente. E quando associada a Anaplasmose, essas apresentaram-se frequentemente em cães com 10 anos. Além disso, a Ehrlichiose esteve predominante em 9 meses do ano, e foi encontrada em 87 cães dos 133 positivos para as hemoparasitoses, o que se pode sugerir que é comum encontrar a doença nos cães da região. A Ehrlichiose canina é uma doença distribuída em regiões tropicais e subtropicais, em áreas urbanas e suburbanas, apresentando como vetor o carrapato *R. sanguineus*, o que predispõe ainda mais cidade de Unaí, Minas Gerais ser considerada uma área endêmica para essa doença e abundante para o vetor (Lima, 2021; Valente, 2014). De acordo com Araújo *et al.*, (2022), o diagnóstico é realizado por meio da junção da anamnese, manifestações clínicas e resultados de exames laboratoriais como, esfregaço sanguíneo, RIFI, ELISA e PCR, sendo esse último o método mais útil na detecção de infecção sanguínea ativa durante a fase clínica da infecção, entretanto, não realizado nesta pesquisa.

No presente estudo foi realizado o ELISA rápido *SNAP 4Dx Plus*, para os 219 testes *SNAP 4Dx Plus* realizados, 41% (89) dos cães foram positivos para Ehrlichioses e Anaplasmoses, sendo estes avaliados também pelo método direto do esfregaço de sangue total. Aproximadamente 31% (41) dos 133 cães positivos para essas hemoparasitas, foram positivos para Anaplasmose, prevalecendo como a hemoparasitose mais encontrada no mês de junho e julho, e a mais frequente em cães com idade inferior a 6 anos quando sozinha, além de estar associada a Erlichiose e a Babesiose em 37% dos casos, mas com idade mais prevalente em cães aos 10 anos (120 meses) como demonstrado no Gráficos 6, quando associada a *Ehrlichia spp.*. Entretanto, 4 cães foram negativos pelo *SNAP 4Dx Plus*, mas, positivos em esfregaço

sanguíneo, sendo 1 caso associado a Babesiose, na qual o cão tinha 4 anos (48 meses). E apenas 1 cão foi positivo em ambos os testes, sendo positivo também para *Ehrlichia spp.*. O método direto para *Anaplasma spp.* e *Babesia spp.* foi o que apresentou melhor resultado quando comparada a *Ehrlichia spp.* que foi mais encontrada pelo teste rápido *SNAP 4Dx Plus*, o que corrobora com o descrito por Araújo *et al.*, (2022) em seus estudos ao afirmar que o método direto como mais específico para diagnosticar Anaplasmose e Babesiose. Além disso, supõe-se que o teste rápido pode resultar de um falso negativo quando o animal não apresenta sintomatologia, com baixa parasitemia. Para diagnóstico da Anaplasmose, Araújo *et al.*, (2022), descreve que, além do esfregaço sanguíneo há diversos testes sorológicos como por exemplo, Fixação do complemento, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), sendo os métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) o melhor método para o diagnóstico, possibilitando a detecção direta do DNA de microrganismos do gênero *Anaplasma* em amostras de sangue e tecido, carrapatos ou outros vetores.

Nesse estudo a *Babesia* spp. foi encontrada somente pelo método direto em esfregaço sanguíneo, pois é considerada um achado em lâmina e não é detectável pelo teste rápido *SNAP 4Dx Plus*. Nesta pesquisa esteve presente em 15% dos cães positivos e apenas no mês de dezembro, prevaleceu como a mais encontrada. Em estudo realizado por Pereira, (2021), o gênero *Babesia* spp. foi o mais diagnosticado e frequente em cães, utilizando o método de diagnóstico direto, no entanto não sendo possível diagnosticar a espécie em questão. Quanto a Babesiose no Brasil, Araújo *et al.*, (2022), descreve que há uma grande incidência do carrapato *R. sanguineus*, o principal, e que o agente etiológico da babesiose canina é *B. canis vogeli.*. O diagnóstico da babesiose canina pode ser conseguido por meio da anamnese e exame físico e clínico do animal, além da utilização de exames laboratoriais que podem permitir até a diferenciação das espécies de *Babesia* spp.. Os hemoparasitas como o *Anaplasma* spp., e *Babesia* spp., geralmente são encontrados em sua maior parte via método direto de esfregaço sanguíneo como proposto por Araújo *et al.*, (2022), e como demonstrado nesse estudo, na qual o método direto prevaleceu representando aproximadamente, 33% dos diagnósticos positivos para esses hemoparasitas. Entretanto, Araújo *et al.*, (2022), descreve que a identificação direta desses hemoparasitas ao microscópio apresenta baixa sensibilidade, já que a parasitemia além de cíclica pode cursar com baixo número de bactérias/protozoários, o que torna difícil a identificação das células parasitadas. Além disso, é necessário o diagnóstico diferencial dos

parasitas de inclusões plaquetárias como núcleos remanescentes de megacariócitos ou granulações para que não haja falso-positivos. Podendo ocorrer nesse estudo, pois houveram animais que foram positivos pelo *SNAP 4Dx Plus*, mas, que não foi encontrado o parasita no método direto. E Pereira, (2018) cita que o uso do teste rápido ELISA somado ao esfregaço sanguíneo é indicado para casos de coinfecções, o que sugere ainda mais que seja realizado.

Já a hepatozoonose não foi encontrada no presente estudo, mas segundo Araújo *et al.*, (2022), é uma doença prevalente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, e já foi relatada em cães domésticos da maioria dos continentes e em numerosos países, incluindo o Brasil, onde apenas a espécie a *H. canis* é considerada como prevalente nas infecções de cães. Os carrapatos *Amblyomma cajennense, A. ovale, Rhipicephalus sanguineus e R. (Boophilus)* podem atuar como vetores do protozoário. No entanto, o *R. sanguineus* é geralmente considerado o seu principal vetor biológico e podem ser vetores desses hemoparasitas (Araújo *et al.*, 2022). O cão ingere o carrapato infectado com oocistos esporulados e se infecta. Em estudos realizados por Finamore (2020), a baixa positividade para a hepatozoonose, se deve provavelmente, pelo estudo ter sido realizado com cães de área urbana, uma vez que a doença ocorre com maior frequência em áreas rurais, região de habitat natural para outro vetor, como o *Amblyomma ovale*. Em outros estudos analisados pelos mesmos autores, a prevalência da infecção do *Hepatozoon spp.* pode chegar a 39% em algumas áreas rurais. O que pode justificar o não diagnóstico dessa enfermidade no presente estudo para a região do Noroeste de Minas Gerais.

Para o diagnóstico dessas hemoparasitoses muitas vezes se associa achados laboratoriais como exame hematológicos e bioquímicos, e devido à alta incidência dessas enfermidades em determinada região, o histórico do animal com relatos de já ter sido parasitado por carrapatos, e a presença, principalmente, de trombocitopenia, leva a suspeitas clínicas para as hemoparasitoses. Entretanto, por mais relacionadas essas alterações, elas não são suficientes para um diagnóstico final, necessitando muitas vezes de outros métodos de diagnóstico, com foi no caso deste trabalho em que se realizou o teste rápido *SNAP 4Dx Plus* e o método direto através do achado de inclusões em esfregaço de sangue total, medula, e de ponta de orelha para confirmar a enfermidade.

Segundo Araújo *et al.*, (2022), sangue de ponta de orelha, sangue proveniente de vasos mais calibrosos como jugular, cefálica ou safena, ou de capa leucocitária, extraída do sangue dos vasos calibrosos são utilizados para realização do esfregaço sanguíneo, sendo a capa leucocitária a que apresenta os melhores resultados para *Anaplasma platys* como obtido em seus estudos de base, entretanto não realizado nesta pesquisa. Araújo *et al.*, (2022) ainda afirma que o esfregaço da capa leucocitária e de sangue proveniente de capilares de ponta de orelha demonstrou ser a melhor técnica de exame microscópico direto para visualização de mórulas de *Ehrlichia spp.*, bem como para visualização de *Babesia spp.*. Podem ser encontrados também gamontes de *Hepatozoon spp.*, visualizados em esfregaços de capa leucocitária e de ponta de orelha, assim como dados obtidos em seus estudos de base, entretanto, não encontrados nesta pesquisa.

Nesse estudo o *SNAP 4Dx Plus* foi o método mais utilizado para detecção dessas hemoparasitoses, sendo o principal método para diagnosticar a Ehrlichiose canina e em alguns casos a Anaplasmose, ou ambos associados. E dos 219 cães testados, aproximadamente 61% foi positivo, entretanto, nem todos os cães apresentaram sintomatologia, mas a maioria dos testes que foram realizados os cães eram suspeitos para alguma hemoparasitose. De acordo com Araújo *et al.*, (2022), quando comparada a outros métodos de diagnóstico, a detecção dos agentes etiológicos pelo esfregaço sanguíneo não é tão efetiva, visto que esses microrganismos são visualizados apenas durante a fase aguda da doença, apresentando, portanto, baixa sensibilidade, principalmente na fase crônica em que a parasitemia é baixa. Outros métodos que podem ser solicitados para diagnóstico dessas hemoparasitoses que são os testes sorológicos ELISA e RIFI, ambos de grande importância clínica, principalmente durante as fases subclínica e crônica da doença, já que a baixa parasitemia dificulta a detecção do agente no exame direto. Estes testes detectam anticorpos precoces em até sete dias após infecção, no entanto, a maioria dos animais é soropositiva apenas após vinte e oito dias de infecção. Segundo Araújo *et al.*, (2022), a RIFI é considerada um teste sorológico quantitativo, já que permite a quantificação de altos ou baixos positivos, e possibilita, também, a identificação da fase da doença em que o paciente se encontra por meio da avaliação da cinética dos anticorpos quando realizada em intervalos semanais. E mesmo em exame molecular o resultado sendo negativo, a persistência de altos títulos ou valores semelhantes no momento do diagnóstico indica persistência da infecção. Além disso, a reinfecção é caracterizada pela rápida ascensão de anticorpos. Já o ELISA, é uma sorologia de caráter qualitativa, que é muito utilizada na rotina clínica devido a

sua rápida e fácil realização, como por exemplo, o teste rápido *SNAP 4Dx Plus* que é um kit de diagnóstico rápido baseado na metodologia ELISA que detecta anticorpos contra diferentes agentes (*E. canis, Anaplasma spp., Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi*). Apesar de serem bastante úteis, o baixo número de anticorpos no início da infecção torna-se um fator desafiador, evidenciando que um resultado negativo neste teste não descarta a possibilidade de um animal estar contaminado.

Ainda segundo Araújo *et al.*, (2022), os testes sorológicos apresentam vantagens em relação aos parasitológicos diretos por possibilitarem maior detecção de indivíduos com anticorpos contra os hemoparasitas. No entanto, esses testes não permitem distinguir uma infecção ativa de uma exposição prévia do agente, o que ocasiona resultados falso-positivos. Além disso, apresentam baixa especificidade, em razão das reações cruzadas com outros agentes e da presença de anticorpos de infecções anteriores. O que poderia ter ocorrido nesse estudo pois alguns animais não tinham histórico clínico e nem sintomatologia para realização de exames específicos.

O teste molecular reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método de diagnóstico que apresenta maior sensibilidade do que os testes sorológicos, principalmente em infecções agudas, sendo o mais apropriado para a detecção do agente em fases crônicas da doença, além de possibilitar a identificação por espécie ou mesmo subespécie do patógeno envolvido assim como proposto por Araújo *et al.*, (2022). Entretanto, não foi um método utilizado nesse trabalho, pois o laboratório não realiza e geralmente não se tem solicitações para sua realização na rotina, por ser um método considerado complexo e laborioso necessitando de técnicos especializados, e por ser de alto custo. Em estudos de Valente (2014), em ausência do método molecular PCR, métodos sorológicos e parasitológicos devem ser utilizados em conjunto para um melhor diagnóstico das hemoparasitoses em cães, que foi o caso dessa pesquisa.

Quanto às raças mais predispostas, neste estudo prevaleceu os caninos sem raça definida (SRD) e o que condiz com o descrito por Berndt (2019) que relatou diferença com base na literatura que sugeria que raças puras eram mais predispostas à infecção por *Anaplasma platys*. No entanto corrobora com Pereira (2021), que encontrou em seu estudo maior prevalência em animais SRD. A segunda raça mais predisposta positiva para as principais hemoparasitoses encontradas nesse estudo foi o Shih tzu. Entretanto, é comum ao atendimento clínico a presença

da raça na região, hipoteticamente por ser uma raça de melhor adaptação a apartamento e pela região de Unaí por exemplo possui grandes quantidades de prédios e consequentemente uma maior população desta raça.

A faixa etária para hemoparasitoses nesse estudo prevaleceu em cães com 60 meses, ou seja, 5 anos, seguidos por cães com 72 meses e 24 meses, 2 e 6 anos respectivamente, para Ehrlichioses. Para Anaplasmose cães com 60 meses (5 anos) e com 12 meses (1 ano), foram os mais encontrados. Para Babesiose, cães com 2 e 3 meses foram os mais predispostos para a enfermidade. E para as associações das hemoparasitoses, para Anaplasma e Ehrlichiose cães com 120 meses, (10) anos foram encontrados em maior número. Entretanto, de acordo com Pereira (2021) na literatura não existe relação a padrões de idade como fator de maior suscetibilidade relacionado a serem animais mais jovens. Pereira, (2021), encontrou a faixa etária dos cães entre 1 a 5 anos, o que também foi encontrado neste estudo, onde a idade prevalente foi entre 12 meses a 6 anos. Mas em estudo de Santarém *and* Aguiar (2016), a idade foi relacionada com o método de diagnóstico na qual pressupõem que animais filhotes <12 meses são mais susceptíveis de se encontrar o agente em citologia direta, o que corrobora com o encontrado para pesquisa de *Babesia spp.* neste estudo.

Quanto ao sexo, em estudos realizados por Pereira, (2021), cães do sexo masculino apresentaram maior prevalência no acometimento e suspeita clínica de hemoparasitoses dos gêneros *Babesia spp., Anaplasma spp.* e *Ehrlichia spp.* No entanto, nesse estudo o sexo que mais prevaleceu foi o feminino, na qual as fêmeas representaram 57% dos cães positivos, o que diferente do que Pereira, (2021) encontrou. Entretanto, Galvão (2018), afirma que não existem pesquisas que comprovem predileção das hemoparasitoses por sexo.

Para Valente (2014), a presença de infecções mistas de hemoparasitos é frequente em áreas endêmicas e pode estar relacionada com a possibilidade de um vetor ser o responsável pela transmissão de mais de um agente. Em seu trabalho as coinfecções encontradas tiveram um predomínio da associação de *E. canis* e *A. platys*, o que reforça a suposição de que o agente da trombocitopenia cíclica canina também seja transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* apontado como principal transmissor de *E. canis, que* no Brasil é comum em áreas endêmicas. Além disso, Valente (2014), complementa ao analisar seus estudos que a baixa sensibilidade encontrada na pesquisa direta para o agente (*Anaplasma platys*) em seu experimento pode ser justificada pela natureza cíclica da doença. Momentos de

trombocitopenia associados à redução da parasitemia durante a evolução da enfermidade tornam o diagnóstico direto de *A. platys* um achado quase acidental.

7.2 DISCUSSÃO: LEISHMANIOSE

Nesse estudo foram realizados durante o ano de 2022 na região Noroeste de Minas Gerais, 173 exames, sendo os métodos sorológicos e direto os de escolha para diagnóstico da Leishmaniose. Desses 173 cães, aproximadamente 52% realizaram o ELISA como método, e aproximadamente 43% realizaram o RIFI D.T, apenas aproximadamente 3% realizaram a pesquisa direta. O que corrobora com o descrito por Lima (2020), na qual descreve que para diagnóstico da Leishmaniose se utiliza métodos sorológicos e métodos direto como o esfregaço sanguíneo. Ainda pressupõe que as vantagens da RIFI como métodos de diagnóstico são o baixo custo, a alta sensibilidade, a relativa velocidade do resultado, sendo mais rápida que a cultura, menos laboriosa que a imuno-histoquímica, mais barata que a PCR, mas não tão rápida quanto os testes rápidos. Além de testar sucessivas diluições do soro do animal até obter fluorescência negativa, método conhecido como "diluição total" e como realizado nesta pesquisa. Esse resultado da diluição total quantifica indiretamente os anticorpos anti-*Leishmania* no soro do animal, sendo divulgado em fração de diluição: 1:40- 1:80-1:160 e assim sucessivamente. A fração denominadora significa quantas vezes o soro foi diluído antes da primeira diluição negativa, sendo considerado um exame diagnóstico quantitativo e associado à carga parasitária. Entretanto, possui como desvantagem a possibilidade de falsos positivos, já que quaisquer anticorpos capazes de se ligar aos diversos antígenos da *Leishmania spp.* aderida na lâmina vão positivar o teste, mesmo este animal nunca sendo exposto ao parasito, fenômeno conhecido como reação cruzada. Nesse estudo a RIFI D.T. foi realizada em aproximadamente 43% dos casos (75) como diagnóstico da Leishmaniose, e foi realizado a diluição total assim como descrito acima. Entretanto, 1 cão foi negativo no RIFI D. T. mas positivo no ELISA. Desses 75 diagnósticos realizados, apenas 20 cães foram positivos, representando 40% dos animais positivos no estudo.

Nesse estudo o ELISA foi o método mais utilizado, representando aproximadamente 52% dos testes realizados, entretanto, somente 21 cães foram positivos, representando 42%, mas 7 animais apresentaram resposta inconclusiva no diagnóstico. O ELISA para Leishmaniose

é um método indireto que detecta anticorpos através da reação enzimática com alteração da cor do substrato. São utilizados antígeno que se deseja testar e permite ter diferentes performances de ELISA dependendo do antígeno que o laboratório de diagnóstico utiliza em suas placas, e como consiste em um antígeno específico aderido à placa, sua chance de reação cruzada é em teoria menor que da RIFI, seu tempo e custo também é menor, já que podem ser testadas várias amostras em uma mesma placa. A desvantagem desse método é que não se recomenda a utilização da absorbância como método quantitativo, já que vários fatores podem alterar esse resultado, além de ser um método indireto, que detecta anticorpos, e não o parasito.

Neste estudo a pesquisa direta foi realizada em 6 animais e resultou como positiva apenas em 2 animais, representando apenas 4% dos animais positivos e aproximadamente 3% dos testes para diagnóstico realizados. O teste imunocromatográfico foi realizado em apenas 2 animais e foi negativo em ambos, representando aproximadamente 1% dos diagnósticos realizados, mas 0% dos animais positivos.

Quanto à idade, a que mais prevaleceu nesse estudo foram cães de 5 anos, onde 10 cães foram positivos, no entanto, 3 com resultados indeterminados. A segunda idade que mais prevaleceu nesta pesquisa foram os cães com 6 anos, com 7 animais positivos, seguida pela mesma quantidade animais de 2 anos, entretanto, com 1 inconclusivo. Em estudos analisados por Bianchini (2023), a idade dos animais variou entre 9 meses a 7 anos. E em Bianchini (2023), a idade mais acometida é de 1 ano, seguido por 5 anos. O presente estudo apresentou resultados semelhantes por Bachini (2023). Entretanto, pode-se supor que o risco para infecção esteja relacionado ao ambiente, pôr a região do Noroeste de Minas Gerais ser considerada uma área endêmica, e por ser uma espécie facilmente domesticada é frequente na região. Assim como descrito por Bachini (2023), animais mais jovens (6 meses a 6 anos), tiveram mais chances de contraírem a doença. Fato que pode estar associado à imaturidade imunológica do animal, na qual animais mais susceptíveis são mais predispostos a desenvolver a doença. Podendo também estar relacionado ao comportamento dos cães, por serem animais mais curiosos e ativos com risco maior de ter contato com os flebotomíneos.

Quanto ao sexo desses animais, 24 cães eram fêmeas e 22 eram machos, entretanto, em 4 cães não foi informado o sexo. Bianchini (2023), encontrou em seus estudos de base mais cães fêmeas positivas do que machos, assim como encontrado neste estudo. Entretanto, alguns autores concluíram que não existe pré-disposição por sexo para acometimento dessa afecção. E

outros autores afirmaram que o sexo não pode ser considerado com fator de risco para leishmaniose. E em sua pesquisa Bianchini (2023) relata sobre uma região também de Minas Gerais, considerada endêmica, que houve predominância de cães machos, diferente do encontrado nesta pesquisa.

Quanto a Raça mais encontrada, não foi possível analisar devido ter sido analisado somente a idade e os resultados. No entanto, em seus estudos Bianchini, (2023) relatou que essas hemoparasitoses foram mais comuns em cães SRD, e que existe pouca relação da raça com a predileção do vetor, estando mais relacionado ao ambiente na qual se encontra o animal. acúmulo de matéria orgânica e lixo em imóveis possibilitou o aumento no risco de contrair a leishmaniose.

Os meses que mais prevaleceram à Leishmaniose foram os meses de março, maio e novembro. Em estudo realizado por Bianchini, (2023), os meses com mais casos foram junho, seguido por março e fevereiro, na qual observou-se que o verão e inverno foram os períodos que registraram um maior número de casos. De acordo com trabalhos analisados por Bachini (2023), o período de maior transmissão ocorre durante e logo após a estação chuvosa, o que proporciona um maior aumento populacional dos vetores, e o período de menor ocorrência é durante a seca. Neste estudo, houve uma maior ocorrência de janeiro a maio, e em novembro e dezembro. O que pode supor que o flebotomíneo é mais presente em período de clima mais quente, sendo que de maio a julho o clima é mais fresco na região, e os outros meses do ano prevalece quente, além também de estar relacionado a estação chuvosa, com maior concentração do vetor, portanto maior propagação da doença.

8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Decorrente aos dados e análises realizados no presente estudo no ano de 2022, pode-se concluir que existe uma prevalência das principais hemoparasitoses que acometem os cães atendidos na cidade de Unaí, Minas Gerais, com Leishmaniose, Ehrlichiose, Anaplasmose e Babesiose encontradas. Supõe-se que a região seja endêmica para Ehrlichiose, Anaplasmose e Babesiose, já que a Leishmaniose já é endêmica na região.

O método de diagnóstico *SNAP 4Dx Plus* foi essencial para o diagnóstico das hemoparasitoses Ehrlichioses e Anaplasmoses encontradas, principalmente quando associadas ao método direto. Já o método direto foi essencial para o diagnóstico das Anaplasmoses, e Babesioses encontradas nesse estudo, principalmente, sendo essa última não detectável pelo método *SNAP 4 Dx Plus*, pois o teste não detecta o antígeno (protozoário *Babesia spp*.), demostrando ainda ser mais sensível para diagnosticar *Anaplasma spp.* do que somente o *SNAP 4 Dx Plus*.

É necessário analisar o histórico clínico do animal e associar a exames laboratoriais (hemogramas e bioquímicos) para que não haja falsos positivos e/ou falsos negativos, obtendo um diagnóstico mais completo. Os métodos de diagnóstico RIFI e ELISA foram essenciais para detecção de Leishmaniose na região, sendo o ELISA de predileção para confirmação da doença. Por fim, ressalta-se a importância do patologista clínico em laboratórios clínicos da região para detecção dos hemoparasitas, principalmente quando realizado o método direto, para diferenciar estruturas hematológicas de hemoparasitas, assim como é realizado no Laboratório Clínico da Pet Stop.

9.0 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. R.; CIRIACO, A. C. M. R.; SANTOS, B. M. B. S.; HEPATOZOONOSE EM CÃES: RELATO DE CASO; XVI Semana Acadêmica; Conexão Unifametro, 2020.

ARAÚJO, R. R.; SANTOS, H. S. P.; SILVA, S. B.; LEAL, S. M. S.; ARAÚJO, E. M.; BARBOSA, A. J.; SANTOS, H. O.; SANTANA, J. L. S.; MOURÃO, A. P. M. S.; BARROS, N. C. B.; SÁ, I.S.; CARDOSO, J. F. S.; AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DAS HEMOPARASITOSES EM CÃES: REVISÃO; Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil; PUBVET, v.16, n.10, a1237, p.1-16, Out., 2022. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n10a1237.1-16>.

BERNDT, T. R.; L. M. J. L. ECCO, L. M. J. L.; SANTI, F. S. C.; NETO, J. B.; VASCONCELOS, A. L.; MENEZES, A. M.; KATAOKA, A.; NOVAIS, A. A. Avaliação comparativa entre as técnicas de confecção do esfregaço sanguíneo de sangue periférico como método diagnóstico de hemoparasitoses em cães (Canis lupus familiaris, Linnaeus, 1758). Scientific Electronic Archives Issue ID: Sci. Elec. Arch, v12, fev., 2019.

BIANCHINI, M. B.; ESTUDO TRANSVERSAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL NA CIDADE DE UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS;Trabalho de Conclusão de Curso; Universidade Federal de Uberlândia; Uberlândia – MG 2023.

FINAMORE, J. G.; ESTUDO RETROSPECTIVO DE HEMOPARASITOSES EM CÃES DA CIDADE DE ITUPEVA – SP; 2020.

GALVÃO, Jonathan David Oliveira de Medeiros. Levantamento de babesia canis (piana and galli -valerio, 1895) em cães domésticos (canis familiaris) no município de acari, região do Seridó do Rio Grande do Norte, brasil. Orientador: Wilson Wouflan Silva. 2018. 31f. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Campina Grande, 2018.

GONÇALVES, S.; BOTTEON, K. D.; HEMOPARASITOSES EM CÃES E GATOS; Do diagnóstico à prevenção; AGENER UNIÃO, BOLETIM PET; VOLUME 05/2015.

LEAL, P. D. S.; MORAES, M. I. M. R.; BARBOSA, L. L. O.; LOPES, C. W. G. Infecção por hematozoários nos cães domésticos atendidos em serviço de saúde animal, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Niterói, v. 37, p. 55-62, 2015.

LIMA, A. L.; LEISHMANIOSE E ERLIQUIOSE CANINA: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICO-LABORATORIAL Tese de Doutorado; Universidade Estadual do Ceará; Fortaleza, Ceará, 2021.

OHANA, J.; SOUZA, M. R. L.; PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *Hepatozoon spp.* NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO ISPA/UFRA; Trabalho de Conclusão de Curso, Belém, Pará, 2022.

PEREIRA, F. R.; CASUÍSTICA DE HEMOPARASITOSES EM CÃES E GATOS - REVISÃO DE LITERATURA; Trabalho de Conclusão de Curso; Universidade Federal Rural da Amazônia; Belém, Pará, 2021.

PEREIRA, M. A. et al. Babesiose canina: relato de caso. Caderno de Ciências Agrárias. v. 10, n. 3, p. 43–47, 2018.

PERES, P. C. O.; SOUSA, K. P.; AMORIM, V. G. A; OLIVEIRA, R. S. S.; NETO, O. J. S.; ASPECTO HEMATOLÓGICOS DE CÃES INFECTADOS POR *HEPATOZOON* EM GOIÂNIA, GOIÁS; Centro Universitário de Goiânia e Universidade Estadual do Goiás; Revista Concilium, Vol. 22, Nº 7, 2022.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose Canina. In: MEGID, J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro, Brasil. p 95 – 111, 2016.

SANTOS, C. M.; CONTE, F. O.; TONIAL, A. L.; DUARTE, V. R.; BAIRROS, A. A.; AQUINO, D. R. R. R. A.; FAVACHO, A. R. M.; OCORRÊNCIA DE HEMOPARASITOSE EM CÃES ATENDIDOS EM HOSPITAL VETERINÁRIO DE CAMPO GRANDE, MATO

GROSSO DO SUL, BRASIL; Brazilian Journal of Animal and Environmental Research; Braz. J. Anim. Environ. Res., Curitiba, v. 1, n. 1, p. 236-243, jul./set. 2018.

SANTOS, H.D.; GALVÃO, S.R.; DIAS, F.E.F; RIBEIRO, T.M.P.; NEGREIROS FILHO, O.; SOUSA, S.A.P.; MINHARRO, S. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the State of Tocantins, Brazil. Ciência Rural, v.47, n. 3, 2017.

SANTOS, M. C. S.; AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS DE IMPORTÂNCIA DIAGNÓSTICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA; Dissertação de Mestrado; Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2020.

SILVA, A. A. F.; JARDIM, C. H.; UNIDADES CLIMÁTICAS EM UNAÍ, NOROESTE DO ESTADO DE MINAS GERAIS- BRASIL: PROPOSTA PRELIMINAR; Geographia Opportuno Tempore Universidade Estadual de Londrina, EISSN: 2358-1972, Volume 5, Número 1, 2019; publicado em outubro de 2019.

SOUZA, L. C.; ERLIQUIOSE CANINA: RELATO DE CASO; Centro Universitário do Sul de Minas; Trabalho de Conclusão de Curso; Varginha, MG, 2021.

SUZANE, P. D. O.; MANEJO AMBIENTAL PARA O CONTROLE VETORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM ÁREAS ENDÊMICAS DO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ, RIO GRANDE DO NORTE; Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Campus de Mossoró, Mossoró/RN, 2021.