

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Análise espacial e caracterização molecular de  
*Babesia vogeli* em cães domiciliados de regiões com  
diferentes gradientes de altitude no estado do Rio de  
Janeiro, Brasil.**

**Tays Araujo Camilo**

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE ESPACIAL E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*BABESIA VOGELI* EM CÃES DOMICILIADOS DE REGIÕES COM  
DIFERENTES GRADIENTES DE ALTITUDE NO ESTADO DO RIO DE  
JANEIRO, BRASIL.**

**Tays Araujo Camilo**

*Sob a orientação do professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

*E coorientação dos professores*  
**Isabele da Costa Angelo**  
**Carlos Luiz Massard**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências Veterinárias**, no Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Novembro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C183a Camilo, Tays Araujo, 1991-  
Análise espacial e caracterização molecular de  
Babesia vogeli em cães domiciliados de regiões com  
diferentes gradientes de altitude no estado do Rio de  
Janeiro, Brasil. / Tays Araujo Camilo. - Seropédica,  
2020.  
64 f. : il.  
  
Orientadora: Huarrisson Azevedo SANTOS.  
Coorientadora: Isabele da Costa Angelo.  
Coorientadora: Carlos Luiz Massard.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2020.  
  
1. babesiose canina. 2. geotecnologia. 3.  
variabilidade genética. I. SANTOS, Huarrisson Azevedo  
, 18/03/1980-, orient. II. Angelo, Isabele da Costa ,  
12/06/1981-, coorient. III. Massard, Carlos Luiz,  
11/10/1947-, coorient. IV Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro. Ciências Veterinárias. V. Título.



ATA Nº 191 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.008699/2021-11

Seropédica-RJ, 08 de fevereiro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
TAYS ARAUJO CAMILO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor(a) em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 11/11/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese.

*(Assinado digitalmente em 08/02/2021 17:51 )*  
CLAUDIA BEZERRA DA SILVA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matrícula: 3103528

*(Assinado digitalmente em 08/02/2021 15:28 )*  
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matrícula: 3701492

*(Assinado digitalmente em 08/02/2021 17:14 )*  
TIAGO MARQUES DOS SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matrícula: 2688704

*(Assinado digitalmente em 11/02/2021 14:03 )*  
NATHALIE COSTA DA CUNHA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 048.263.207-01

*(Assinado digitalmente em 10/02/2021 23:43 )*  
ARTUR KANADANI CAMPOS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 029.143.896-20

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **191**, ano:  
**2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **08/02/2021** e o código de verificação: **d52ce27606**

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a toda a minha família, aos amigos de vida e amigos da labuta, assim como à Universidade, que tanto me acolheu. Certa vez, no início da graduação, minha mãe me perguntou se eu imaginava quando eu sairia da Rural e eu disse: não sei, acho que só quando eu for doutora. Vida vai, vida vem, aqui estou. Embora este tenha sido meu desejo desde o início, admito que somente cheguei até aqui, pois fui abraçada, aconselhada, amada e apoiada por todos vocês. Sozinha, eu nada seria. Agradeço!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a todos, que por minha vida passaram. Sou grata por todas as pessoas que eu conheço e provavelmente foram convidados para estar nesta defesa. Sou grata pelo acolhimento de todos quando cheguei na Rural. A todos os funcionários, secretárias e professores. A todos os estudos em grupo, todos os risos, choros e provas. Muitas provas que me fizeram chegar até aqui. Agradeço pelo apoio do Walter, prof. Carlos Wilson e Gisele, que me receberam no início da minha vida acadêmica me ensinando muito sobre coccidios e pela prof. Graça, que me acolheu no curto estágio em imunologia. À prof. Valéria, que me orientou no Relatório final do Curso e que se tornou uma grande amiga para a vida.

Agradeço a banca que aceitou o convite para me avaliar. Aos meus coorientadores prof. Isabele e prof Massard. Ao meu orientador, Huarrisson!

Agradeço imensamente o acolhimento que recebi no laboratório LHV! Todo o ensinamento recebido pelo Marquinhos, Maristela, Claudinha, Gabriela, Dani, Renata e Luiza. Em especial, sou grata principalmente do prof. Huarrisson e Massard, que foram os responsáveis pela abertura de todas estas portas da pós-graduação.

Agradeço a todos meus amigos e colegas do LASAVE, minha família destes últimos anos. Todos vocês contribuíram para eu conseguir chegar até aqui! Em especial, agradeço a Nat, Patrícia, Lúcia, Miguel, Thamyris, Thamires, Débora, Carol, Marlon, Roberta e Josemar que foram essenciais para eu conseguir ir em frente todos os dias apesar dos desalentos.

Aos amigos e colegas de PPGCV que foram por muitas vezes colegas de classe, colegas de provas e testes. Somos fortes meus amigos. Não se esqueçam disso.

Aos meus amigos das andanças de plantões de final de semana e feriado, eu aprendi muito, mas muito mesmo com vocês! E ainda aprendo. E só nós, que fazemos uma vida de dupla carga de trabalho ou tripla nem sei mais dizer, sabemos que damos duro para dar conta de todos os sonhos e necessidades que cabem em nós, principalmente vivendo neste país que não valoriza a ciência com bolsas mais dignas.

Aos meus amigos de conversas, baralhos, festas, choros, risos e principalmente ensinamentos. Com vocês, sou eu sem travas, sem julgamentos, sem máscaras sociais, muito obrigada! Eu aprendi a ser humana com vocês.

Ao meu companheiro Fabrício, que esteve ao meu lado em todos os momentos da pós.

Aos meus psicólogos, que graças a eles consigo conhecer mais os universos que existem em mim e poder conquistar todos os dias o meu eu em potencial.

Aos meus colegas, amigos e alunos da UFV, minha atual moradia, obrigada por todo o acolhimento.

À minha família, sem vocês, não existo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

## **BIOGRAFIA**

Paulista, paulistana, moradora de Carapicuíba, estudante de escola pública, médica veterinária, mestre em ciências veterinárias, professora de saúde de aves e agora, vou ser doutora em ciências veterinárias. Estudante de teatro, apaixonada pela educação, apaixonada por ensinar. Apaixonada por sorrisos, apaixonada por apresentações. Filha de Isabel Cristina e Marcelo Aires. Neta de nordestinos, que ensinaram desde muito cedo o valor de uma profissão. Estagiária de cães e gatos, equinos, silvestres, coccídeos, hemoparasitos. Encantada pela história das doenças, sua transmissão e seu agentes e com muitos sonhos a frente. Minha biografia não poderia ser longa, pois ainda estou no início do caminho.

## RESUMO

CAMILO, Tays Araújo. **Análise espacial e caracterização molecular de *Babesia vogeli* em cães domiciliados de regiões com diferentes gradientes de altitude no estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2020. 64 p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

As piroplasmoses caninas são causadas por hemoprotozoários transmitidos por carrapatos pertencentes as famílias Babesiidae e Theileriidae e que geram prejuízos a saúde dos cães. No Brasil existem descrições da ocorrência das espécies *Babesia gibsoni*, *Rangelia vitalii* e *Babesia vogeli*, sendo essa última a espécie mais prevalente em cães. Por meio das geotecnologias obtém-se a distribuição espacial de casos de piroplasmose em cães, através do mapeamento de informações de importância epidemiológica, tal como fatores associados à infecção por *B. vogeli*, tanto bióticos quanto abióticos. Logo, contribuindo com a elaboração de ações de controle e prevenção mais efetivas. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo epidemiológico transversal de 12 meses com cães domiciliados do estado do Rio de Janeiro, nos municípios de: Barra do Piraí e Paracambi, com altitude abaixo de 600 metros e Petrópolis e Teresópolis, acima de 600 m. A detecção de DNA dos piroplasmas foi realizada através da reação de Nested-PCR, seguida de purificação e sequenciamento das amostras positivas. Também foi realizado o georreferenciamento de todos os locais de coleta de amostras dos animais e os casos positivos foram analisados quanto a distribuição espacial por meio do mapa de Kernel no software QGIS e a investigação de autocorrelação espacial dos casos positivos pelo software GeoDa. A análise epidemiológica foi realizada pelo cálculo do Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher com 95% de confiabilidade. A Regressão logística foi realizada pelo método de Wald com “cut-off” de 0,1. Foi realizada análise de entropia da sequência 18SrDNA de *B. vogeli*, análise filogenética e a distância evolutiva entre sequências de *B. vogeli* do mundo. Foi encontrada uma prevalência absoluta de cães positivos de 7,9% (n=36/456), que após a análise filogenética evidenciou unicamente a espécie *B. vogeli*, com percentual de identidade variando entre 99,9% a 100% tanto entre as sequências do estudo quanto com *B. vogeli* de outros países. Quanto à distribuição espacial dos casos positivos, o mapa de kernel evidenciou a região abaixo de 600m de altitude com maior frequência de casos, corroborando com o resultado encontrado na regressão logística, que mostrou a associação da altitude abaixo de 600m (p=0,04; IC: 1,03-5,007; OR: 2.29) com cães positivos para *B. vogeli*. O período chuvoso (p= 0,01; IC: 1.20-5.01; OR: 2.45) e a infestação por *Rhipicephalus sanguineus* (p=0,02; IC: 1.14-5.38; OR: 2.47) também foram variáveis associadas com a presença de DNA de *B. vogeli* em cães. Por meio do Índice de Moran de Autocorrelação espacial local (LISA) foi possível verificar que há correlação espacial entre altitude e casos positivos (Moran's I: -0,605, pseudo p-valor 0,001) e altitude e presença de carrapatos (Moran's I: 0,222, pseudo p-valor 0,046). Na análise de entropia, a região V4 da sequência 18SrRNA de *B. vogeli* foi a que apresentou maior variabilidade, no entanto, a matriz evolutiva de distâncias identificou variação de 0 a 0,007, com média de 0,001, permitindo observar homogeneidade genética entre as sequências do estudo. Este estudo contribuiu com a aquisição de informações epidemiológicas de fatores abióticos ambientais diretamente relacionados a infecções por *B. vogeli* em cães em municípios com diferentes gradientes de altitude no estado do Rio de Janeiro. A exposição dos dados através dos mapas temáticos e análise espacial dos casos positivos favorecem a ampliação de dados epidemiológicos que podem auxiliar em posteriores protocolos preventivos e de controle desta doença nas regiões estudadas.

**Palavras-chave:** babesiose canina; geotecnologia; variabilidade genética.



## ABSTRACT

CAMILO, Tays Araújo. **Spatial analysis and molecular characterization of *Babesia vogeli* in dogs living in regions with different altitude gradients in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** 2020. 64 p. Thesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Dog pyroplasms are caused by haemoprotozoa transmitted by ticks belonging to the Babesiidae and Theileriidae families and are a health hazard to dogs. In Brazil there are descriptions of the occurrence of *Babesia gibsoni*, *Rangelia vitalii* and *Babesia vogeli*, this last being the most prevalent species in dogs. Through geotechnologies, the spatial distribution of pyroplasmosis cases in dogs is obtained by mapping information of epidemiological importance, such as factors associated with both biotic and abiotic *B. vogeli* infection. Thus, contributing to more effective control and prevention actions. The aim of this study was to conduct a 12-month cross-sectional epidemiological study of dogs domiciled in Rio de Janeiro State, in the municipalities of Rio de Janeiro: Barra do Pirai and Paracambi, with altitude below 600 meters and Petrópolis and Teresópolis, above 600 meters. The detection of pyroplasm DNA was performed through the reaction of Nested-PCR, followed by purification and sequencing of positive samples. Georeferencing of all sample locations of the animals was also performed and the positive cases were analysed for spatial distribution using the Kernel map in the QGIS software and the investigation of spatial autocorrelation of the positive cases by the GeoDa software. The epidemiological analysis was performed by calculating the Chi-square or Fisher's Exact test with 95% confidence. Logistic regression was performed by the Wald method with a cut off of 0.1. Entropy analysis of the 18SrDNA sequence of *B. vogeli*, phylogenetic analysis and the evolutionary distance between *B. vogeli* sequences of the world were performed. An absolute prevalence of positive dogs of 7.9% (n=36/456) was found, which after phylogenetic analysis showed only the species *B. vogeli*, with a percentage of identity ranging from 99.9% to 100% both between sequences of the study and with *B. vogeli* from other countries. Regarding the spatial distribution of positive cases, the kernel map showed the region below 600m of altitude with higher frequency of cases, corroborating with the result found in the logistic regression, which showed the association of altitude below 600m (p=0.04; CI: 1.03-5.007; OR: 2.29) with positive dogs for *B. vogeli*. The rainy season (p= 0.01; CI: 1.20-5.01; OR: 2.45) and *Rhipicephalus sanguineus* infestation (p=0.02; CI: 1.14-5.38; OR: 2.47) were also variables associated with the presence of *B. vogeli*'s DNA in dogs. Through Moran's Index of Local Spatial Autocorrelation (LISA) it was possible to verify that there is spatial correlation between altitude and positive animals (Moran's I: -0.605, pseudo p-value 0.001) and altitude and presence of ticks (Moran's I: 0.222, pseudo p-value 0.046). In entropy analysis, the V4 region of the 18S rRNA sequence of *B. vogeli* was the one with the highest variability; however, the evolutionary matrix of distances identified variation from 0 to 0.007, with a mean of 0.001, allowing to observe genetic homogeneity between the sequences of the study. This study contributed to the acquisition of epidemiological information on environmental abiotic factors directly related to *B. vogeli* infections in dogs in municipalities with different altitude gradients in the state of Rio de Janeiro. Data exposure through thematic maps and spatial analysis of positive cases favour the expansion of epidemiological data that can assist in subsequent preventive and control protocols for this disease in the regions studied.

**Keywords:** canine babesiosis; geotechnology; genetic variability.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Fatores associados à infecção pelas espécies de Babesiidae: <i>Babesia vogeli</i> e <i>Rangelia vitalii</i> .....	8
<b>Quadro 2.</b> Fatores associados à infecção pelas espécies de Theileriidae.....	9

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo do ciclo de vida da *Babesia* spp. Do lado esquerdo da imagem está a fase do ciclo dentro do vetor artrópode, representado pela reprodução assexuada. E do lado direito do esquema está a fase de reprodução binária no hospedeiro vertebrado. Sz – esporozoítas; T – trofozoíta; M – merozoítas; G – pré-gametócitos; SK – corpos raiados ou também conhecidos como corpos de Strahlenkörper; Z – zigoto diploide; Ts: transmissão transtestadial e To, transmissão transovariana; Sg – glândula salivar (Fonte da imagem: MELHORN; SCHAIN, 1984 apud SCHNITTGER et al., 2012).....6
- Figura 2** - Mapa de localização das coletas realizadas de Novembro de 2018 a Outubro de 2019. Canto esquerdo superior – Mapa do Brasil; canto esquerda inferior: mapa do estado do Rio de Janeiro. A direita: Mapa dos municípios de coleta. Sistema de Referência SIRGAS 2000. Fonte: IBGE.....16
- Figura 3** - Mapa temático demonstra a distribuição geográfica dos 456 pontos de coleta de dados epidemiológicos por entrevista e sangue de cães, para a detecção do alvo *18S rRNA* de *Babesia vogeli* em sangue de cães domiciliados de quatro municípios de duas regiões com diferentes altitudes (abaixo de 600m e acima de 600m).....17
- Figura 4** - Gel de Agarose 1% demonstrando a integridade do DNA genômico extraído de amostra de sangue de cães, visualizado sob luz ultravioleta em sistema de foto documentação. Fonte: Arquivo Pessoal.....19
- Figura 5** - Gel de Agarose 2% corado com Brometo de etídeo demonstrando o limite de detecção da primeira e da segunda reação de Nested PCR para o alvo *18S rDNA* de parasitos da ordem Piroplasmida. A primeira reação apresentou limite de detecção de  $10^3$  cópias e na segunda até  $10^1$ .....21
- Figura 6** - Mapa de pontos associados aos diferentes gradientes de altitude que o estado do Rio de Janeiro do presente estudo, com curvas de nível estilo Jenks para melhor visualização.....24
- Figura 7** - Organograma demonstrando a sequência de eventos no processo de coleta de amostras de sangue de cães nos municípios de Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....25
- Figura 8** - Distribuição das amostras coletadas ao longo dos meses (eixo x) e detecções positivas da sequência *18S rDNA* de *Babesia vogeli* em um período de 12 meses de coleta (eixo y), de Novembro de 2018 a Outubro de 2019..... 26
- Figura 9** - Análise de entropia da sequência parcial *18S rDNA* de *Babesia vogeli* com 1600 nucleotídeos com foco na variação correspondente à região hipervariável V4.....27
- Figura 10** - Árvore filogenética, estimada pelo método de Máxima Verossimilhança a partir de sequências parciais *18S rDNA* de *Babesia vogeli* e outras espécies do gênero *Babesia* spp. e *Rangelia* sp., *Theileiria* sp. e *Cytauxzoom felis*. Os números nas ramificações indicam o valor do Bootstrap em 1000 réplicas. A sequência EU052685 de *Cardiosporidium cionae* foi usada como grupo externo.....30
- Figura 11** - Árvore filogenética estimada pelo método de Máxima Verossimilhança a partir de sequências parciais *18S rDNA* de *Babesia vogeli* de diversas partes do mundo.....32
- Figura 12** - Dados de pluviosidade média obtidos pelo site Climate.org dos meses de coleta de Novembro de 2018 a Outubro de 2019 (eixo x) do estado do Rio de Janeiro analisados em conjunto com os cães positivos na reação de nPCR a partir da sequência *18S rRNA* de *Babesia vogeli* (eixo).....35
- Figura 13** - Dados de temperatura média obtidos pelo site Climate.org dos meses de coleta de Novembro de 2018 a Outubro de 2019 (eixo x) analisados em conjunto com os cães positivos

na reação de nPCR a partir da sequência 18S rRNA de <i>Babesia vogeli</i> (eixo y).....	35
<b>Figura 14</b> - Pontos de coleta com amostras positivas na detecção da sequência do 18S rDNA de <i>Babesia vogeli</i> nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis - Rio de Janeiro, 2018-2019.....	37
<b>Figura 15</b> - Mapa de Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene 18S de rDNA de <i>Babesia vogeli</i> em região de baixada e serrana do estado do Rio de Janeiro entre novembro de 2018 à outubro 2019.....	39
<b>Figura 16</b> - Diagrama de espalhamento de Moran entre cães positivos e altitude indicando pontos de associação espacial positiva entre os quadrantes 1 e 2.....	40
<b>Figura 17</b> - Mapa de cluster de correlação espacial de casos positivos de <i>Babesia vogeli</i> x altitude. O gráfico é dividido em quatro quadrantes de acordo com os quatro cenários emergidos do agrupamento LISA. Os pontos vermelhos mostraram a alta correlação espacial com casos positivos e altitude e os pontos em azul mostraram a correlação mais baixa em ambas as variáveis. As outras cores não tiveram correlação espacial.....	41
<b>Figura 18</b> - Mapa de agrupamento de correlação espacial de casos positivos de <i>Babesia vogeli</i> e a presença de carrapato demonstrando baixa dependência espacial dos cães positivos com a variável presença de carrapatos. O gráfico é dividido em quatro quadrantes de acordo com os quatro cenários emergidos do agrupamento LISA. Os pontos vermelhos mostraram alta correlação espacial com casos positivos e presença de carrapatos e o ponto rosa mostrou alta correlação espacial nos casos positivos, mas menor com presença de carrapatos. As outras cores não tiveram correlação espacial.....	41
<b>Figura 19</b> - Mapa de cluster de correlação espacial de cães infestados por carrapatos e a altitude. O gráfico é dividido em quatro quadrantes de acordo com os quatro cenários emergidos do agrupamento LISA. Os pontos vermelhos mostraram alta correlação espacial com presença de carrapatos e altitude e os pontos azuis mostraram baixa correlação em ambas as variáveis. As outras cores não tiveram correlação espacial.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distância evolutiva (distância-p) entre as sequências de <i>18S rDNA</i> de <i>Babesia vogeli</i> obtidas de cães naturalmente infectados em Paracambi, Barra do Pirai, Teresópolis e Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. ....	27
<b>Tabela 2</b> - Análise descritiva e bivariada dos fatores ambientais realizada pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher em cães naturalmente infectados com <i>Babesia vogeli</i> nos municípios de Paracambi, Barra do Pirai (baixa altitude) e Petrópolis e Teresópolis, (alta altitude) no estado do Rio de Janeiro.....	33
<b>Tabela 3</b> - Análise descritiva e bivariada das características intrínsecas de cães calculada pelo Qui-quadrado ou teste exato de Fisher em cães naturalmente infectados por <i>Babesia vogeli</i> dos municípios de Paracambi, Barra do Pirai (baixa altitude) e Teresópolis, Petrópolis (alta altitude) no Estado do Rio de Janeiro.....	36
<b>Tabela 4</b> - Análise de regressão logística dos fatores associados com cães positivos para <i>Babesia vogeli</i> através da reação de Nested PCR em municípios de baixa e alta altitude do estado do Rio de Janeiro.....	37
<b>Tabela 5</b> - Distribuição dos pontos de coleta analisados no presente estudo realizado em quatro municípios de diferentes altitudes, no estado do Rio de Janeiro, no período de novembro de 2018 à outubro de 2019. Apresentação de dados interpolados pelo “Método do Vizinho Mais Próximo”.....	38
<b>Tabela 6</b> - Distribuição dos positivos na detecção da sequência do <i>18S rDNA</i> analisados no presente estudo realizado em quatro municípios de diferentes altitudes, no estado do Rio de Janeiro, no período de novembro de 2018 à outubro de 2019. Apresentação de dados interpolados pelo “Método do Vizinho Mais Próximo”.....	38

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Família Babesiidae .....	3
2.2 Família Theileriidae.....	4
2.3 Distribuições geográfica dos piroplasmas caninos.....	4
2.4 Ciclo de vida.....	5
2.5 Vetor transmissor.....	7
2.6 Epidemiologia.....	8
2.7 Manifestações clínicas.....	9
2.8 Tratamento.....	10
2.9 Biologia, controle e prevenção de vetores.....	11
2.10 Diagnóstico.....	12
2.11 Georreferenciamento e análise espacial .....	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1 Área de estudo .....	16
3.2 Amostragem .....	17
3.4 Questionário epidemiológico semiestruturado .....	18
3.5 Coleta de sangue e carrapatos.....	18
3.6 Extração de DNA total e padronização das amostras.....	19
3.7 Determinação do controle positivo e negativo .....	19
3.8 Detecção molecular de hemoparasitas da ordem Piroplasmida .....	20
3.9 Limites de detecção .....	20
3.10 Cuidados para evitar contaminação.....	22
3.11 Purificação dos produtos e sequenciamento.....	22
3.12 Análise filogenética da sequência <i>18S rDNA</i> .....	22
3.13 Variabilidade genética da sequência <i>18S rDNA</i> de <i>Babesia vogeli</i> .....	23
3.14 Análise estatística.....	23
3.15 Análise Espacial .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1. Esquemas de coleta, prevalência e dados de positivos por município, zona e mês de coleta .....	25
4.2 Análise filogenética e de variabilidade.....	26
4.3 Análise estatística .....	33
4.4 Análise espacial .....	37
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As piroplasmoses caninas são doenças de caráter cosmopolita e emergente (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; INÁCIO *et al.*, 2019) causadas por protozoários incluídos nas famílias Theileriidae e Babesiidae, pertencentes a ordem Piroplasmorida, filo Apicomplexa (LORETTI; BARROS, 2005). Esses agentes são transmitidos por carrapatos pertencentes à família Ixodidae (DE SOUSA *et al.*, 2018; JALOVECKA *et al.*, 2018; LORETTI; BARROS, 2005; SOARES *et al.*, 2011, 2018), tais como *Amblyomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. Esta última abrange a espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, que é mais comum em cães tanto em áreas rurais quanto urbanas (DANTAS-TORRES, 2010), apresentando potencial de transmissão para uma grande variedade de patógenos, incluindo agentes zoonóticos (DANTAS-TORRES, 2008).

Os hemoprotozoários da família Babesiidae se apresenta de forma endêmica em países tropicais e subtropicais e com maior prevalência comparada a famílias da mesma ordem (INÁCIO *et al.*, 2019; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016). Também é incluída nesta família a espécie *R. vitalii*, que apesar de ter diferentes células alvos no início da infecção, a distância filogenética encontrada a incorpora à família das babesias (SOARES *et al.*, 2011; 2018). No Brasil, as espécies já descritas foram *R. vitalii* relatada em cães na América do Sul (ARAUJO *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2020; INÁCIO *et al.*, 2019; LEMOS *et al.*, 2012; PAULINO *et al.*, 2018; PESTANA, 1910), *Babesia gibsoni* (TRAPP *et al.*, 2006) e *Babesia vogeli*, que inclusive, é a espécie mais prevalente dentre os piroplasmas que acometem cães na América do Sul (ARAUJO *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2020; INÁCIO *et al.*, 2019; LEMOS *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2005; PAULINO *et al.*, 2018).

A família Theileriidae, compreende dois gêneros: *Theileria* (LAVERAN, 1901), que possui alta relevância para equídeos, gerando grandes prejuízos a saúde destes animais e econômicos para a equideocultura (ROTHSCHILD, 2013) e *Cytauxzoon* (NEITZ; THOMAS, 1948) que é um importante agente que acomete felinos (COHN; BIRKENHEUER, 2012). Dentre as espécies de maior ocorrência nos equídeos, *Theileria equi* apresenta relatos de infecção em cães (BECK *et al.*, 2009; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; INÁCIO *et al.*, 2019; MATJILA *et al.*, 2008), mas nenhuma descrição de infecção por *Theileria* sp. em cães foi realizada no Brasil, assim como nenhuma descrição foi feita de *Cytauxzoon* em cães até a presente data.

No contexto brasileiro da babesiose canina, sabe-se que muitos médicos veterinários, por diferentes motivos, realizam o tratamento contra *Babesia* sp. de forma presuntiva, amparados apenas por alterações hematológicas, como por exemplo a trombocitopenia, que é comum a muitas outras hemoparasitoses (MACIEIRA *et al.*, 2005). No entanto, para a execução de um tratamento babesida mais eficiente, a seleção do método diagnóstico é importante (MRLJAK *et al.*, 2017), assim como o conhecimento dos fatores de risco que cerceiam a tríade epidemiológica tradicional: hospedeiro, agente etiológico e fatores ambientais que envolvem a dinâmica do vetor (GORDIS, 1996).

As técnicas de diagnóstico com detecção de alvos moleculares, como a sequência 18S *rDNA*, contribuíram com a geração de informações adicionais à biologia desses agentes, assim como o conhecimento de variáveis favoráveis à ocorrência de infecções por piroplasmas em animais (INÁCIO *et al.*, 2019; PAULINO *et al.*, 2018; PECKLE *et al.*, 2013, 2018; PIRES, 2013). Ademais, quando se acrescenta o sequenciamento genético, é possível reconhecer o polimorfismo de espécies piroplasmas, conforme a relação que a variabilidade em sequências tem com a variedade de vetores competentes (PAULINO *et al.*, 2018).

Em relação a epidemiologia, os fatores preditivos com envolvimento de variáveis ambientais são reconhecidos como associados à dinâmica do vetor, tais como: zona de estudo (urbana/rural) (PAULINO *et al.*, 2018), estação do ano (RENÉ-MARTELLET *et al.*, 2015),

temperatura (ZHANG *et al.*, 2019), altitude (TSATSARIS *et al.*, 2016), vegetação (CABEZAS-CRUZ *et al.*, 2019), época chuvosa ou seca (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2012). Assim como são reconhecidos fatores intrínsecos ao hospedeiro, que podem favorecer a infecção por *B. vogeli*, como a idade (ROTONDANO *et al.*, 2015), gênero (MAIA *et al.*, 2007) e raça (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2009). Além disso, também é necessário pontuar fatores referentes à dinâmica comportamental a qual o animal é exposto, como viagens com os tutores, que podem favorecer o trânsito de animais infectados para locais indenes com presença de vetor competente (BANETH *et al.*, 2012) e a falta de controle de ectoparasitos em cães, principalmente em animais que apresentam contato com outros animais (DANTAS-TORRES, 2010).

As ferramentas conhecidas como GIS do inglês “*Geographic Information System*”, contribuíram com a implementação de medidas preventivas na vigilância em saúde na atenção básica (SANTOS; NOUR, 2017), além de agregar informações aos estudos epidemiológicos relacionados à doenças zoonóticas (CONNOR *et al.*, 1997). O uso de análises espaciais no conhecimento de distribuição de doenças transmitidas por carrapatos pode ampliar o conhecimento relacionado a fatores abióticos relacionados à ecologia dos agentes, ao vetor-transmissor e ao ambiente no qual estes se relacionam entre si (BECK, 2000).

Na Medicina Veterinária, Mrljak et al (2017) utilizam o mapa de kernel para analisar a distribuição de doenças transmitidas por carrapatos na Croácia, o que permite ampliar os estudos epidemiológicos a respeito destas patologias, sendo então uma proposta multidisciplinar que identifica e demonstra a necessidade de incentivos a estudos desta magnitude. Nas doenças transmitidas por carrapatos, as ferramentas GIS também podem ser essenciais para a determinação de estratégias de controle e monitoramento de espécimes e espécies responsáveis pela transmissão de diversos patógenos (TORINA *et al.*, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo a execução de um estudo epidemiológico transversal de 12 meses e o geoprocessamento de dados, relacionados à detecção de agentes piroplasmas em cães domiciliados em regiões de alta (acima de 600 m) e baixa altitude (abaixo de 600 m) no estado do Rio de Janeiro. Além disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a heterogeneidade das sequências *18S rRNA* identificadas em cães das diferentes regiões. Essas informações sobre os fatores associados à transmissão destes patógenos têm como objetivo influenciar futuros trabalhos relacionados à área, além de agregar conhecimento sobre o comportamento desta doença em cães para que sejam realizadas medidas de controle e prevenção mais assertivas.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Babesiidae

Os agentes do gênero *Babesia* (LEVINE, 1973), pertencentes à família Babesiidae, infectam uma variedade de animais. A classificação inicial do gênero foi realizada por meio de análise de espécimes em lâminas de microscopia, através da técnica de visualização de esfregaços sanguíneos. A morfometria subdividia em espécies de pequenas e grandes babesias, estando incluídas *Babesia gibsoni* e *Babesia canis* respectivamente nesta classificação (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2008). Com o advento das ferramentas moleculares, foi possível constatar que as grandes babesias, representadas por três subespécies englobadas dentro *B. canis*, apresentava-se sob três classificações filogenéticas distintas, logo ficaram conhecidas as diferentes espécies, como: *B. canis*, *B. vogeli* e *Babesia rossi* (KELLY; KOSTER; LOBETTI, 2015; UILENBERG, 2006).

Segundo a revisão Homer *et al.*, (2000), nos livros bíblicos, em Êxodos 9:3, um dos primeiros relatos de babesiose tenha sido descrito, conforme o quadro clínico de hematúria:

...saiba que a mão do Senhor trará uma praga terrível sobre os rebanhos do faraó que estão nos campos: os cavalos, os jumentos, os camelos, os bois e as ovelhas.

Na época, os egípcios conheciam o quadro clínico observado como “m3:r1n”, que significava morte, traduzido no inglês como “Murrain”, termo usado na idade média para representar o quadro que levava a morte de ruminantes. O agente causador da moléstia nos animais foi reconhecido e nomeado como *Babesia* spp. por Victor Babés, em 1888, que estudava febre acompanhada de hemoglobinúria em bovinos, e em 1892, Babés novamente encontrou o protozoário em eritrócito de ovelha. Os pesquisadores, Piana e Galli-Valerio (1895), na Itália, realizaram as descrições de microrganismos com similaridade morfológica ao descrito em 1888, só que em cães, classificando os como *B. canis* (RONCALLI, 2001). Existem múltiplas descrições de babesiose ocorrendo numa variedade de espécies de vertebrados, incluindo os seres humanos (SCHNITTGER *et al.*, 2012), sendo considerado um problema de saúde pública (MADISON-ANTENUCCI *et al.*, 2020)

A espécie *R. vitalii*, anteriormente chamada de *B. vitalii*, foi relatada em 1908, por Antônio Carini, como causador de uma nova doença no Brasil, sendo conhecida pelo nome indígena Guarani “nambiuuvú”, que significava “orelhas de sangue”, que é uma apresentação clínica patognomônica de rangeliose aguda em cães (CARINI, 1908 *apud* CARINI; MACIEL, 1914; FRANÇA *et al.*, 2014). Em 1910, Pestana nomeou a espécie como *Piroplasma vitalii*, devido à similaridade com os microrganismos do grupo dos Apicomplexas. A classificação como uma nova espécie ocorreu em 1914, quando Carini e Maciel (1914) observaram que o ciclo deste hemoprotozoário se diferenciava dos demais piroplasmas, parasitando macrófagos e células endoteliais, além de eritrócitos. Logo foi chamada então de *R. vitalii* em homenagem a Rangel Pestana, considerado o primeiro a descrever o agente (FRANÇA *et al.*, 2014). Ainda assim, apesar do comportamento intraeritrocitário próprio do gênero *Babesia* e a forma extraeritrocitária, similar a outros hemoprotozoários como *Toxoplasma gondii* ou *Leishmania* spp. (MOREIRA, 1938; PARAENSE; VIANNA, 1948), *R. vitalii* é incluída à família Babesiidae (LEVINE, 1973; SOARES *et al.*, 2018), sendo então o primeiro gênero desta família a ser transmitido por vetores do gênero *Amblyomma* (SOARES *et al.*, 2018).

## 2.2 Família Theileriidae

Dentre as hemoparasitoses de importância para equideocultura, estão *Babesia caballi* (NUTALL, 1912) e *Theileria equi* (MEHLHORN; SCHEIN, 1985). Os primeiros relatos de *Theileria* spp. ocorreram em 1883, por Wiltshire, denominado inicialmente de *Babesia equi* (HENNING, 1949) e nomeado por Laveran (1901) como *Piroplasma equi*, devido a morfologia piriforme observada em microscopia. No ano seguinte, Arnold Theiler, em uma tentativa de infecção experimental em equinos, observou que o carrapato estava associado ao ciclo de transmissão do agente etiológico como vetor em potencial (THEILER, 1903). Tanto a família *Babesiidae*, quando *Theileriidae* possui os carrapatos como os responsáveis pela transmissão dos agentes para os animais, sendo considerados os hospedeiros definitivos destes hemoprotozoários, visto que a fase sexual da multiplicação dos piroplasmas ocorre dentro do vetor (MEHLHORN; SCHEIN, 1985) ocorrendo uma especificidade entre o agente e o vetor, restringindo a transmissão destes patógenos a certas espécies de carrapatos (KAKOMA; MEHLHORN, 1994; SCOLES; UETI, 2015).

Além de infectar equinos, *T. equi* pode ser encontrada no sangue de cães (ADAMU *et al.*, 2014; CHISU *et al.*, 2019; INÁCIO *et al.*, 2019) e gatos (MINERVINO *et al.*, 2020). Outra espécie conhecida por acometer canídeos é *Theileria annulata* (CRIADO *et al.*, 2006), não sendo encontrado relato destes agentes no Brasil até a presente data.

Dentre os hematozoários, o gênero *Babesia* é o segundo mais encontrado no sangue de mamíferos (podendo também infectar aves), estando abaixo somente dos tripanossomas. E *Babesia* spp., assim como as espécies de *Theileria*, são reconhecidos como piroplasmas ou piroplasmidas (KAKOMA; MEHLHORN, 1994; SCHNITTGER *et al.*, 2012).

## 2.3 Distribuições geográficas dos piroplasmas caninos

Os casos de infecção por *Babesia* spp. podem ser encontradas em todos os continentes devido sua ampla distribuição, no entanto algumas espécies apresentam variadas incidências, conforme a região e/ou país de estudo. A princípio, a espécie *Babesia conradae* é circulante nos Estados Unidos (DEAR *et al.*, 2018; KJEMTRUP *et al.*, 2006) e a espécie *B. gibsoni* é comum no continente Asiático (JONGEJAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2009), também com relatos deste agente etiológico na África, nas Américas do Sul e do Norte (BIRKENHEUER *et al.*, 1999; MACINTIRE *et al.*, 2002) e também descrições na Europa (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003), sendo considerada cosmopolita (SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011).

No continente Africano a espécie circulante é *Babesia rossi* (JACOBSON, 2006; KELLER *et al.*, 2004), que apresenta perfil endêmico na África do Sul (KELLY; KOSTER; LOBETTI, 2015); A espécie zoonótica, *Babesia vulpes*, anteriormente chamada de *T. annae* (antiga *Babesia microti*-like) (BANETH *et al.*, 2015) ocorre em países europeus, tais como Espanha e Portugal (BARASH *et al.*, 2019; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2008). Em relação ao velho mundo, na Europa, a espécie predominante é *B. canis* (BOURDOISEAU, 2006; CARLI *et al.*, 2009) podendo também ser encontrada na Ásia (RAR *et al.*, 2005).

Considerada também com distribuição cosmopolita, *B. vogeli* pode ser encontrada em muitos países (SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011) e é a espécie mais prevalente no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2020; LORETTI; BARROS, 2005; PASSOS *et al.*, 2005). Embora alguns autores tenham encontrado a espécie *B. gibsoni* no país, observada em esfregaço sanguíneo (BRACCINI *et al.*, 1992) e detectado por técnica molecular por Trapp *et al.*, (2006).

A espécie *Rangelia vitalii* foi relatada no sudeste e sul do Brasil (DE SOUSA *et al.*, 2018; FRANÇA *et al.*, 2014; INÁCIO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019). Também existem

relatos dessa espécie na Argentina (EIRAS *et al.*, 2014), Uruguai (SOARES *et al.*, 2014) e Paraguai (INÁCIO *et al.*, 2019).

Em relação ao gênero *Theileria*, a espécie *T. equi* é usualmente relacionada a infecções em cavalos (HOMER *et al.*, 2000; PECKLE *et al.*, 2013), mas já foi detectada em cães em países europeus, como Portugal, França (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003) e Croácia (BECK, RELJA *et al.*, 2009), no continente Africano, na Nigéria (ADAMU *et al.*, 2014) e na América do Sul, no Paraguai (INÁCIO *et al.*, 2019). Na Espanha foi descrita a ocorrência de *T. anullata* em cães (CAMACHO *et al.*, 2001; CRIADO *et al.*, 2006; ZAhLER *et al.*, 1998). Em relação as babesioses equinas, a espécie *B. caballi* também já foi descrita em cães assintomáticos na Europa (BECK *et al.*, 2009).

## 2.4 Ciclo de vida

O ciclo de vida dos piroplasmidas apresenta uma homogeneidade em relação as etapas de replicação dos piroplasmas, tal como: a merogonia, que sempre ocorre nos eritrócitos de hospedeiros vertebrados; enquanto isso, a reprodução sexual ocorre nas células intestinais dos carrapatos, com posterior invasão de tecidos internos do artrópode pelos esporozoítas (JALOVECKA *et al.*, 2018).

As diferenças dentre os gêneros de piroplasmas então relacionadas ao alvo de invasão celular primário. Nas espécies do gênero *Babesia*, os esporozoítas irão invadir os eritrócitos, seguido para a diferenciação em trofozoítas. Através da divisão assexuada, conhecida também como fusão binária, ocorre a fase do ciclo chamada de merogonia, que dependendo da espécie, irá formar dois ou quatro merozoítas e, ao final da multiplicação binária, estes saem dos eritrócitos, gerando hemólise por apoptose, para em seguida invadir novas células do mesmo tipo (UILENBERG, 2006). Contudo, alguns merozoítas podem se diferenciar, no momento da replicação dentro dos eritrócitos, em pré-gamontes e serem absorvidas pelo vetor artrópode no momento de ingurgitação. No intestino do vetor os pré-gametas se transformam em gametócitos de diferenciação binária (fêmeas e machos), e estes corpos raiados agora formados, permitem a replicação sexual do protozoário e a produção do gamonte (forma alongada, representativa do zigoto (MEHLHORN; SCHEIN, 1985).

Após a produção do gamonte, por meio da meiose, as formas haploides geradas, conhecidas como cinetos, invadem a hemolinfa do carrapato, levando a invasão de diferentes órgãos, incluindo a glândula salivar e ovários. Na glândula salivar, os cinetos se diferenciam em esporozoítas e estes estão prontos para uma nova invasão de células em hospedeiros vertebrados (SCHNITTGER *et al.*, 2012).

A transmissão pode correr de duas formas: transestadial, em que ocorre a passagem do agente etiológico entre as fases de vida do carrapato (larva, ninfa e adulto), ou por transmissão transovariana, gerando larvas já com o patógeno após a eclosão de ovos de fêmeas ingurgitadas (MEHLHORN; SCHEIN, 1985; SCHNITTGER *et al.*, 2012) – (Figura 1).

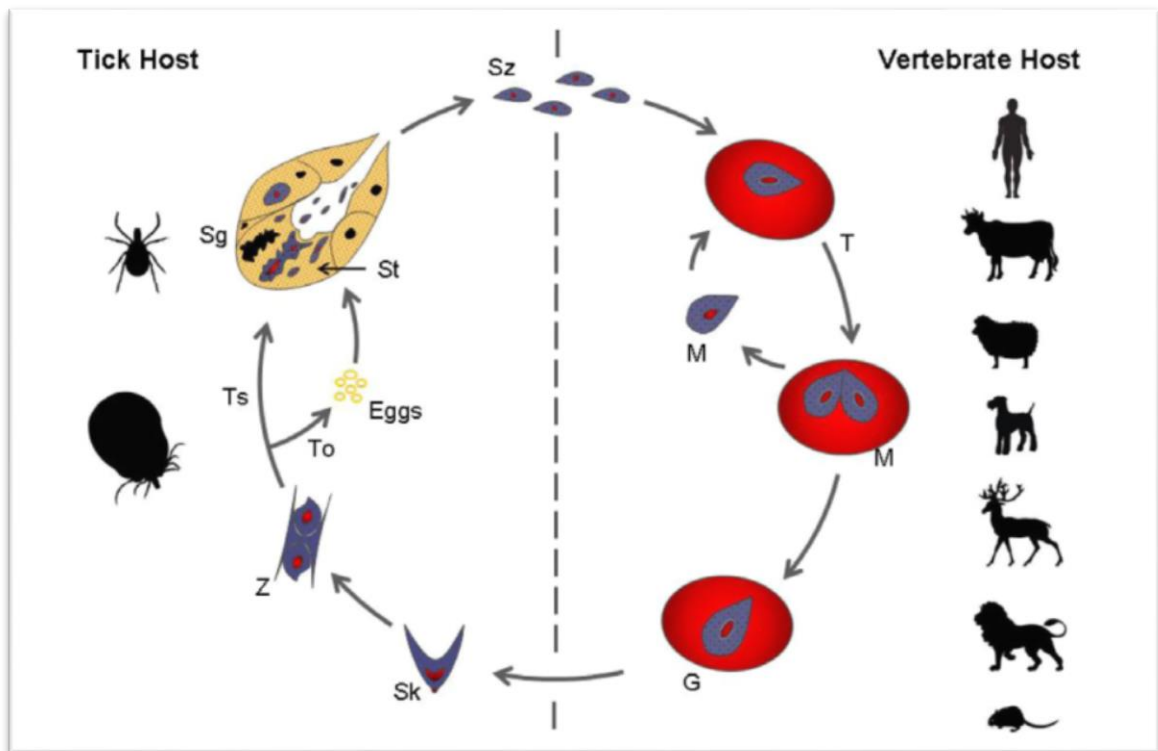


Figura 1 - Esquema representativo do ciclo de vida da *Babesia* spp. Do lado esquerdo da imagem está a fase do ciclo dentro do vetor artrópode, representado pela reprodução assexuada. E do lado direito do esquema está a fase de reprodução binária no hospedeiro vertebrado. Sz – esporozoítas; T – trofozoíta; M – merozoítas; G – pré-gametócitos; SK – corpos raiados ou também conhecidos como corpos de Strahlenkörper; Z – zigoto diploide; Ts: transmissão transtestádica e To, transmissão transovária; Sg – glândula salivar (Fonte da imagem: MEHLHORN; SCHAIN, 1985 *apud* SCHNITTGER *et al.*, 2012).

No caso de *Theileria* spp., a esquizogonia ocorre inicialmente em células brancas, como monócitos e linfócitos, para que depois ocorra a invasão de eritrócitos do hospedeiro vertebrado, onde irá ocorrer a reprodução assexuada (BISHOP *et al.*, 2004). O ciclo da espécie *R. vitalii* destoa dos outros piroplasmas, pois é possível encontrar trofozoítas deste agente nos eritrócitos do hospedeiro, assim como na *Babesia* spp. e nos leucócitos, assim como na *Theileria* spp., podendo também ser encontrado no plasma sanguíneo e células endoteliais (FRANÇA *et al.*, 2014). Já foi descrito na literatura a transmissão transesdadial dessa espécie no vetor (SOARES *et al.*, 2014).

Quando ocorre uma infestação de carrapatos infectados no hospedeiro vertebrado, o esporozoíta do agente, presente na glândula salivar do ectoparasito, torna-se maduro e infeccioso após dois ou três dias, possibilitando a transmissão do piroplasmida após alguns dias de ingurgitação, como é o caso da transmissão de *B. canis* por *Ixodes* (carrapatos de carapaça dura), que precisa de dois dias de infestação para efetivar a transmissão (SCHORDERET-WEBER *et al.*, 2017).

No caso de *B. gibsoni*, poderá ocorrer a transmissão deste patógeno entre hospedeiros vertebrados, por meio de brigas entre cães, pois devido as injúrias teciduais, é possível ocorrer uma potencial troca de fluídos, viabilizando a transmissão do agente já presente na corrente sanguínea (KELLY; KOSTER; LOBETTI, 2015). Em relação à transmissão transovária, já foi observada em carrapatos infectados por *B. gibsoni*, assim como *B. canis* (MIERZEJEWSKA *et al.*, 2016) e *T. annae* (SIMÕES *et al.*, 2011).

É possível observar que há semelhança entre os ciclos de vida dos piroplasmidas, a começar pela via de transmissão, que ocorre por meio da saliva dos carrapatos (Ixodidae), contendo os esporozoítas, que são inoculados no hospedeiro vertebrado no momento de ingestão do vetor artrópode (MEHLHORN; SCHEIN, 1993; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

## 2.5 Vetor transmissor

Dentre os artrópodes responsáveis pela transmissão de diversos patógenos para vertebrados estão os mosquitos e os carrapatos (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2016). A família Ixodidae compreende carrapatos de carapaça dura e que são responsáveis pela transmissão de diferentes agentes de importância em saúde pública e médico veterinário, conhecidas como doenças transmitidas por carrapatos, do inglês “*Tick-borne diseases*” - TBD’s (OTRANTO *et al.*, 2014). A distribuição geográfica das diversas espécies dos Ixodidae varia conforme as diversas condições abióticas e bióticas, como altitude, mudanças ambientais, urbanização e população de hospedeiros vertebrados (ESTRADA-PENNA, 2015).

Antigamente, acreditava-se na existência de carrapatos espécie-específicas para a transmissão de babesias para cães, sendo: *Dermacentor reticulatus* incriminado na transmissão de *B. canis canis*; *R. sanguineus* por *B. canis vogeli* e *Haemophysalis leachi* e *H. elliptica* pela transmissão de *B. canis rossi* (COLLETT, 2000; UILENBERG *et al.*, 1989), embora, sabe-se atualmente, que *R. sanguineus* sensu lato, conhecido popularmente como carrapato marrom/vermelho do cão, é um vetor competente das três espécies e adaptável à variações ambientais, sendo encontrado em todo o mundo (LATRIELLE, 1806 *apud* CARRET *et al.*, 1999). Além disso, é o principal vetor de *B. vogeli* no mundo (ZAHLER *et al.*, 1998), inclusive no Brasil (PASSOS *et al.*, 2005; PAULINO *et al.*, 2018).

A espécie *B. gibsoni* é transmitida na Ásia pelos carrapatos da espécie *Haemophysalis longicornis* e *Haemaphysalis bispinosa*, no entanto, em outros países é possível encontrar descrições deste agente sendo transmitida por outras espécies de carrapatos, além da possibilidade de transmissão por meio de brigas entre cães (UILENBERG, 2006; ZAHLER *et al.*, 1998). Dentre as espécies carrapatos com potencial de transmissão de *B. gibsoni* está *R. sanguineus* s.l. (TRAPP *et al.*, 2006).

O vetor competente na transmissão de *R. vitalii* no Brasil e no Paraguai é a espécie *Amblyomma aereolatum* (INÁCIO *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2018). Este vetor é comum em países da América do Sul, que já reportaram a ocorrência de Rangeliose (ARZUA *et al.*, 2003; EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; GUGLIELMONE *et al.*, 2003; LABRUNA *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2002) e é uma das espécies de carrapatos mais comuns em áreas rurais, podendo também infestar outros hospedeiros vertebrados, tal como canídeos silvestres (LORETTI; BARROS, 2005; SOARES *et al.*, 2014) e até mesmo pássaros (ARZUA *et al.*, 2003; OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011).

Até o presente momento, não foi relatada a presença de *R. vitalii* em carrapatos da espécie *R. sanguineus*, logo, não existem evidências que esta espécie de vetor seja competente na transmissão do agente (EIRAS *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2018). No trabalho de Soares *et al.*, (2018), observou-se, com outras espécies do gênero *Amblyomma*, que a espécie *A. aereolatum* apresenta uma maior distribuição em locais com detecção de *R. vitalii*, comparada a outras espécies do mesmo gênero, acreditando-se que este seja o vetor natural do agente na América do Sul.

Em relação as piroplasmoses equinas, os gêneros *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* são descritos como vetores responsáveis pela transmissão de *B. caballii* e *T. equi* na Croácia e acredita-se que sejam os responsáveis pela transmissão dos hemoprotozoários também em cães (BECK *et al.*, 2009). Na América do Sul, os carrapatos responsáveis pela transmissão dos piroplasmata equinos são as espécies *Dermacentor nitens* e

*Rhipicephalus microplus*, no Paraguai (PALLARES; USHER, 1982; NAVA *et al.*, 2007; QUINLAN; SCARONE; LANERI, 1980). No Brasil, a espécie *A. sculptum* é apontada como vetor competente de *T. equi*. (KERBER *et al.*, 2009; PECKLE *et al.*, 2013). Em relação a *R. sanguineus*, alguns estudos em diferentes países, observaram que esta espécie, predominante em cães, também é um potencial vetor de *T. equi* (BECK *et al.*, 2009; CHISU *et al.*, 2019; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; SALIM *et al.*, 2019).

## 2.6 Epidemiologia

A espécie *B. vogeli* apresenta uma prevalência variável na América do Sul, com detecção molecular da sequência *18S rDNA*: o Paraguai apresenta uma taxa de prevalência de 6% (n=23/384) (INÁCIO *et al.*, 2019), Colômbia apresenta 5.4% (n=5/91) (VARGAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012) e o Brasil apresenta uma taxa que varia entre 14.10% (n=55/390) (PAULINO *et al.*, 2018) a 30,67% (n=92/300, sendo somente 17 destes 92 selecionados para a detecção molecular) (BARBOSA *et al.*, 2020). No Paraguai, existe uma prevalência de 4% (n=1/23) da espécie *R. vitalii*, (INÁCIO *et al.*, 2019) e no Brasil esta taxa varia entre 6.8% (n=7/103) (LEMOS *et al.*, 2012) a 30% (n=6/20) (SOARES *et al.*, 2014) A *Theileria* sp. também apresenta 4% (n=1/23) de prevalência no Paraguai (INÁCIO *et al.*, 2019). Diversos são os fatores associados às infecções por *Babesia* spp., *Rangelia vitalii* e *Theileria* spp. em cães.

Dentre os fatores que podem favorecer a presença destes agentes em cães, estão:

**Quadro 1.** Fatores associados à infecção pelas espécies de Babesiidae: *Babesia vogeli* e *Rangelia vitalii*.

Fatores associados	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Rangelia vitalii</i>	Autores
Presença do vetor competente	X	X	BEUGNET; MOREAU, 2015; CASSINI <i>et al.</i> , 2009; CHISU <i>et al.</i> , 2019; LORETTI, A.P.; BARROS, 2004; PASSOS <i>et al.</i> , 2005; PAULINO <i>et al.</i> , 2018; RENÉ-MARTELLET <i>et al.</i> , 2015; SOARES <i>et al.</i> , 2018
Região	X	X	BARBOSA <i>et al.</i> , 2020; CASSINI <i>et al.</i> , 2009; COHN, L.A., BIRKENHEUER, 2012; GUGLIELMONE <i>et al.</i> , 2003; INÁCIO <i>et al.</i> , 2019
Idade	X		BARBOSA <i>et al.</i> , 2020; PAULINO <i>et al.</i> , 2018; SILVA <i>et al.</i> , 2019; SOLANO-GALLEGO, LAIA <i>et al.</i> , 2016; SOLANO-GALLEGO, LAIA; BANETH, 2011
Raça	X		ARAUJO <i>et al.</i> , 2015; BARBOSA <i>et al.</i> , 2020
Sexo	X		MAIA <i>et al.</i> , 2007
Cães de canil	X		CASSINI <i>et al.</i> , 2009
Cães sem abrigo	X		PAULINO <i>et al.</i> , 2018
Fatores ambientais	X		RENÉ-MARTELLET <i>et al.</i> , 2015

Condições de  
higiene do local

X

PAULINO *et al.*, 2018

**Quadro 2.** Fatores associados à infecção pelas espécies de Theileriidae

<b>Fatores associados</b>	<b>Autores</b>
Presença do vetor competente	CHISU <i>et al.</i> , 2019
Altitude	PECKLE <i>et al.</i> , 2013; PIRES, 2013; SANTOS, HUARRISSON A. <i>et al.</i> , 2013
Presença de animais domésticos	GARCÍA-BOCANEGRA <i>et al.</i> , 2013; MORETTI <i>et al.</i> , 2010; PECKLE <i>et al.</i> , 2013
Variações climáticas	MORETTI <i>et al.</i> , 2010
Umidade	(STEINMAN <i>et al.</i> , 2012; ZEMTSOVA <i>et al.</i> , 2016)
Manejo	PIRES, 2012
Categoria de trabalho do cavalo	PECKLE <i>et al.</i> , 2013

## 2.7 Manifestações clínicas

Os sinais clínicos apresentados pelos cães podem variar conforme a espécie infectante e também conforme o estado imunológico do animal infectado, não obstante, também influenciado por questões intrínsecas do animal, como idade (ROTONDANO *et al.*, 2015; SALIM *et al.*, 2019) e presença de comorbidades e/ou infecções concomitantes com outros hemoparasitos, que podem diminuir a imunidade destes animais frente ao hemoprotozoário (IRWIN, 2009; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011; TAENZLER *et al.*, 2016). Os sinais clínicos comuns à infecções por *Babesia* spp. são: prostração, anorexia, palidez em mucosas, febre, linfadenomegalia, anemia e hemoglobinúria, podendo também apresentar icterícia, dependendo da evolução do quadro. Em relação a anormalidades encontradas por meio de diagnósticos diferenciais, é possível observar na ultrassonografia, casos de esplenomegalia e em exames sanguíneos, as anormalidades mais comuns são trombocitopenia, anemia, hipoalbumemia, hiperbilirrubinemia, além do possível aumento das enzimas hepáticas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011).

Quanto a virulência, a espécie que mais se destaca dentre as *Babesia* spp. é *B. rossi*, que pode gerar quadros neurológicos, falha renal aguda e edema pulmonar, por consequências da anemia hemolítica aguda causada nos cães infectados (JACOBSON, 2006). Não obstante, a espécie *B. vogeli*, que geralmente gera quadros subclínicos ou com baixa gravidade em cães adultos é classificada como a de menor patogenicidade, embora os casos em filhotes abaixo de 5 meses possam ser fatais (IRWIN, 2009; KELLY; KOSTER; LOBETTI, 2015; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011). O agravamento em quadros de infecção por *B. vogeli* também podem ocorrer frente à Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) e síndromes múltiplas orgânicas, que podem levar à hipotensão e até ao choque séptico (MATIJATKO *et al.*, 2009), assim como em animais idosos (SALIM *et al.*, 2019) ou cães que possuem alguma disfunção hormonal ou renal (SCHOEMAN *et al.*, 2009; ZYGNER *et al.*, 2015). Por fim, as infecções concomitantes de outras hemoparasitos também podem agravar a infecção por *B. vogeli* (FÖLDVÁRI *et al.*, 2016).

Em relação as duas alterações hematológicas comuns, encontradas em infecções por *Babesia* spp, estão a anemia e a trombocitopenia. No caso da anemia, esta ocorre por diversos mecanismos incluindo, lise dos eritrócitos, tanto por hemofagocitose esplênica quanto por hemodiluição, sendo caracterizada como anemia regenerativa (KELLY; KOSTER; LOBETTI, 2015; MATIJATKO *et al.*, 2009; ZYGNER *et al.*, 2015). No caso da trombocitopenia, as possíveis causas de sua ocorrência são: consumo, sequestro e supressão da produção de plaquetas pela medula óssea, mediada pela resposta do sistema imune (FURLANELLO *et al.*, 2005) e coagulopatias mediante infecção pelo piroplasma (RUIZ DE GOPEGUI *et al.*, 2007).

Na Rangeliose, os sinais clínicos são similares aos que ocorrem em infecções graves por *Babesia* spp., como febre, anemia e icterícia, podendo também apresentar hemorragias em trato gastrointestinal e cavidade oral, epistaxe persistente e hemorragias em ponta de orelha. Os achados laboratoriais dessa doença incluem a anemia regenerativa, comum aos piroplasmas, e visualização de esferocitose (hemácias microcíticas com alta concentração de hemoglobina), além de trombocitopenia e bilirrubinemia (DA SILVA *et al.*, 2011; FRANÇA *et al.*, 2014; LORETTI; BARROS, 2004; SILVA *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2011).

No caso da Theileriose, cães acometidos por *T. equi* geralmente não apresentam sintomas (BECK *et al.*, 2009; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003) ou quando apresentam, são geralmente sintomas inespecíficos, independente se a infecção ocorrer por *T. equi* ou por *T. annulata* (ADAMU *et al.*, 2014). O mesmo pode ocorrer em infecções por *T. annae* (reclassificada como *Babesia vulpes*), com a apresentação de apresentar sinais inespecíficos e achados laboratoriais não patognomônicos, como trombocitopenia (BARASH *et al.*, 2019; CAMACHO *et al.*, 2001; MIRÓ *et al.*, 2015).

## 2.8 Tratamento

Existe uma variedade de drogas no mercado, com ação efetiva para infecções causadas por hemoprotozoários do gênero *Babesia*, além das combinações também utilizadas e, ainda que não exista clareza quanto ao mecanismo de ação das drogas no tratamento da babesiose, as referências de tratamento clínicos encontrados na literatura nos permitem definir protocolos de tratamento mais efetivos. O dipropionato de imidocarb é um medicamento amplamente utilizado nos tratamentos de Babesiose e Tripanossomíase, induzindo a interrupção da multiplicação do parasito (PLUMB, 2015).

Drogas antibióticas como doxiciclina, metronidazol entre outras, são amplamente utilizadas no tratamento de hemoparasitoses, no entanto não possuem efeito babesicida, pois não efetuam a eliminação do agente etiológico (FARWELL; LEGRAND; COBB, 1982; SAKUMA; SETOYUCHI; ENDO, 2009; SUZUKI *et al.*, 2007). É importante ressaltar que o uso indiscriminado de antibióticos causa resistência bacteriana, podendo inviabilizar tratamentos futuros e problemas relacionados à saúde pública (FYFE *et al.*, 2016).

O tratamento de Rangeliose é similar ao da Babesiose, com drogas como Acetato de diminazeno, dipropionato de imidocarb, doxiciclina e azul tripan (CARINI; MACIEL, 1914; LORETTI; BARROS, 2005). Devido à anemia aguda e, para diminuir os fatores de imunomediação, pode-se associar corticoides ao tratamento específico (FRANÇA *et al.*, 2010; LORETTI; BARROS, 2005). O acetato de diminazeno não tem indicação no Brasil, devido à alta toxicidade que pode gerar nos animais, podendo leva-los a morte, porém é utilizado na devido sua eficácia no tratamento para *B. rossi* (NAUDÉ *et al.*, 1970 apud FRANÇA *et al.*, 2014). Atualmente não existem tratamentos descritos na literatura para Theileriose em cães, uma vez que esta patologia não causa sintomas (SALIM *et al.*, 2019).



## 2.9 Biologia, controle e prevenção de vetores

A espécie *R. sanguineus* s.l., também conhecida como carrapato marrom do cão é uma espécie com ampla distribuição e boa adaptação ao meio urbano, tendo sua reprodução e manutenção favorecida em ambientes quentes e úmidos, clima comum de países subtropicais e tropicais no mundo (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004), como o Brasil. Além do cão, este vetor pode infestar uma variedade de espécies de vertebrados diferentes, incluindo seres humanos, podendo estar envolvido na transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa (DANTAS-TORRES, 2008). Apesar de essa espécie ser bem adaptada às mudanças climáticas e ambientais observadas ao longo dos anos, isso pode ser um fator de favorecimento do ciclo de vida destes vetores, permitindo um aumento de casos de doenças transmitidas por carrapatos, incluindo as zoonóticas (BOUCHARD *et al.*, 2018; 2019).

Algumas características são favoráveis a boa adaptação ao meio urbano. Segundo Dantas-Torres *et al.*, (2010), *R. sanguineus* é endofílico e nidícola, podendo então sobreviver e se reproduzir em casas de cachorros, paredes e diversos ambientes em tenham condições favoráveis de temperatura e umidade ao desenvolvimento de suas três fases (larva, ninfa e adulta). A transmissão de *B. vogeli* por esta espécie fica garantida em todas as fases de vida do vetor, pois este agente etiológico apresenta transmissão transestadial e transovariana no carrapato (CHAUVIN *et al.*, 2009). Sendo o Brasil um país de clima tropical, a manutenção do vetor no meio urbano é garantida por todo o ano e, quando o carrapato não está infestando o hospedeiro, este geralmente se encontrará presente no ambiente em que o animal vive (LABRUNA; PEREIRA, 2001)

O cão é a espécie de hospedeiro de predileção do *R. sanguineus* e, apesar deste vetor ser caracterizado como monotrófico (que se alimenta da mesma espécie animal durante o ciclo de vida) também demonstra mecanismo evolutivo de sobrevivência relacionado a promiscuidade em infecções de diferentes espécies de hospedeiros, incluindo o homem e diversas espécies domésticas, garantindo assim sua perpetuação (DANTAS-TORRES, 2010). O tempo de alimentação no vetor pode variar de um a dois dias, no estágio de larva e até semanas, nas fêmeas de ninfas e adultas (KOCH, 1982; TROUGHTON; LEVIN, 2007). Já os machos, necessitam de numerosos períodos de alimentação, devido uma menor capacidade física de ingurgitação em relação as fêmeas, podendo se alimentar de um ou mais hospedeiros (LITTLE; HOSTETLER; KOCAN, 2007).

O tempo de permanência do vetor no hospedeiro é crucial para a transmissão da doença, pois este período é necessário para que a forma infectante do agente (o esporozóito), presente na glândula salivar seja liberado na corrente sanguínea do cão. No caso de *B. rossi*, por exemplo, o carrapato, macho ou fêmea, precisa de no mínimo 24 horas de alimentação no hospedeiro (BEUGNET; LEBON; DE VOS, 2019).

Diversas drogas estão disponíveis no mercado com o objetivo de limitar infestações por ectoparasitos em cães e nos domicílios, no entanto, algumas substâncias já possuem resistência comprovada e não garantem a ação carrapaticida que propõem, como por exemplo, as substâncias compostas por deltametrina, fipronil e ivermectina, que já apresentam eficácia reduzida quanto ao controle de *R. sanguineus* (BECKER *et al.*, 2019). Logo, é possível encontrar no mercado uma variedade de produtos com drogas associadas, que potencializam o efeito do ectoparasiticida, como de marcas conhecidas como Frontline Tri-Act®/Frontect® (Merial®) que contém a associação de fipronil com permetrina (JONGEJAN *et al.*, 2019) e novas formulações de uso oral a base de Afoxolaner (Nexgard® - Merial®) e Sarolaner (Simparic® - Zoetis®), além do uso oral e tópico de Fluralaner (Bravecto® - MSD Saúde Animal®) e de outros produtos de usos diversos como coleira antiparasitas e spot-on.

## 2.10 Diagnóstico

Há uma variedade de métodos diagnósticos possíveis para detectar piroplasmas, tal como o exame direto, conferido pela microscopia óptica, que permite visualizar as formas de merozoítos intraeritrocíticos nas células sanguíneas por meio da coloração celular de lâminas contendo esfregaço do sangue marginal das pontas das orelhas de hospedeiros potencialmente infectados (BARBOSA *et al.*, 2020). A espécie pode ser determinada por visualização microscópica conforme a morfometria apresentada, segundo Schoeman (2009) grandes babesias (2.4 x 5 µM), contendo quantidades variáveis de corpos piriformes dentro de eritrócitos e pequenas babesias (1 x 3.2 µM), que geralmente apresentam-se únicas.

Em relação a *R. vitalii*, também é possível encontrar formas piriformes, geralmente apresentadas em pares, dentro de eritrócitos, células endoteliais e leucócitos. A visualização é laboriosa em baixa parasitemia, sendo mais visíveis em quadros agudos (FRANÇA *et al.*, 2014), o que é comum também nos casos de *B. vogeli* (SILVA *et al.*, 2020; HOMER *et al.*, 2000; KELLY; KOSTER; LOBETTI, 2015). A histologia de fragmentos de órgãos como fígado, baço, rins, pulmões e medula óssea permitem a visualização de um maior número de espécimes de *R. vitalii*, podendo ser observado em células endoteliais capilares e reticuloendoteliais (CARINI; MACIEL, 1914; CARINI, 1948; LORETTI; BARROS, 2005).

No caso de *T. equi* é possível observar a presença de merozoítos nos eritrócitos (2-3 µM) com formato piriforme, arredondado ou ovoide (SUMBRIA *et al.*, 2014). Outro formato possível que esta espécie pode apresentar é a organização de quatro estruturas em “cruz de malta” (DE WALL, 1992). Além disso, esta espécie é menor do que *B. caballi*, que também ocorre em equinos (MALEKIFARD *et al.*, 2014).

A microscopia, apesar de ser uma técnica barata e específica (BREITSCHWERDT *et al.*, 1983) em alguns momentos pode ser considerada uma forma de diagnóstico limitada por alguns fatores, como: demanda experiência do profissional principalmente em casos crônicos ou de baixa parasitemia, incluindo casos atípicos, pois a visualização pode ser inviável (UILENBERG *et al.*, 1989). Além disso, esta técnica não permite a distinção genotípica recurso este que tornou conhecidas outras espécies que ampliaram o conhecimento sobre o agente, devido a variabilidade encontrada relacionada a quesitos de virulência, resposta antígeno-anticorpo, especificidade vetor-transmissor (IRWIN, 2009; SCHETTERS *et al.*, 1997; SOLANO-GALLEGO; BANETH, 2011; ZAHLER, M. *et al.*, 2000) e resposta a drogas específicas (BEUGNET; MOREAU, 2015; BOOZER; MACINTIRE, 2003).

O método sorológico também é amplamente utilizado em diversos trabalhos para detecção de anticorpos contra *Babesia* spp. e *Theileria* spp., como vantagem, cita-se que este é um método menos laborioso, em relação a visualização microscópica, contudo, os limitantes da técnica devem ser esclarecidos: os anticorpos presentes no organismo do animal permanecem após a infecção cessar, pois o sistema imunológico apresenta memória humoral, logo, podem ocorrer falsos-positivos. Os casos de falsos-negativos também são relatados, visto que, no início da infecção, a conversão sorológica pode não ter ocorrido, devido a menor sensibilidade da técnica comparada a outros métodos, como os moleculares (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016; TABOADA; MERCHANT, 1991; WEILAND, 1986). Neste caso então, ressalta-se que os principais erros diagnósticos e limitação da técnica, são: no caso dos falsos-positivos, podendo identificar áreas endêmicas incorretamente ou no caso de falsos-negativos, em que o animal pode servir como reservatório para os demais, além do risco de expor o animal à uma infecção latente ou crônica, dependendo da resposta imunológica do animal (HOMER *et al.*, 2000; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016).

O diagnóstico da babesiose também pode ser realizado por citometria de fluxo como ferramenta quantitativa para infecção. É um método indireto de diagnóstico, que permite identificar a presença do DNA do parasito em células através da visualização microscópica com coloração de fluoróforo (BICALHO; RIBEIRO; MARTINS-FILHO, 2004; FUKATA *et*

*et al.*, 1996). É uma técnica sensível e facilita a detecção de infecções iniciais e um alto número de amostras ao mesmo tempo (BICALHO; RIBEIRO; MARTINS-FILHO, 2004). Contudo a análise dos dados obtidos demanda experiência e utilização de softwares.

No Brasil, a babesiose canina tem alta prevalência, demonstrada através de estudos sorológicos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2020; OTRANTO *et al.*, 2014) e baixa prevalência em exames de análise de esfregaços em microscópio (BARBOSA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; O'DWYER *et al.*, 2009). Os estudos sorológicos dificultam a distinção de espécies, pois podem apresentar respostas cruzadas dos anticorpos, dificultando as análises microscópicas. Dessa forma não seria assertivo excluir a possibilidade de infecção no animal, devido a limitação da análise por alguns fatores como fases e grau de infecção (CARRET *et al.*, 1999).

As técnicas moleculares são ferramentas diagnósticas indicadas para infecções por hemoparasitos, pois são sensíveis e específicas para detecção e permite também a distinção genotípica (CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2003; FRITZ, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016). Dentro da biologia molecular, existe uma variedade de técnicas como a detecção por Reação da Cadeia da Polimerase - PCR convencional (DUARTE *et al.*, 2008), uso de enzimas de restrição – PCR-RFLP (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2008), multiplex para detecção de *Babesia* e outros hemoparasitos (KLEDMANEE *et al.*, 2009), PCR em tempo real – qPCR (PAULINO *et al.*, 2018), Multiplex qPCR (PELEG *et al.*, 2010) e Nested – PCR (INÁCIO *et al.*, 2019; JEFFERIES *et al.*, 2007).

Os estudos moleculares relacionados aos piroplasmidas em geral, como a *Babesia* spp. geralmente utilizam a sequência alvo 18S do DNA ribossomal para as detecções e caracterizações genotípicas (CASTRO *et al.*, 2020; JEFFERIES *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2005, PAULINO *et al.*, 2018), sendo uma ferramenta excelente para auxiliar na detecção do patógeno, mesmo em baixas parasitemias. Contudo, além do gene 18S outros genes podem ser utilizados na detecção, como por exemplo, o gene *hsp70* utilizado no trabalho de Paulino *et al.* (2018).

Além da distinção genotípica, com o uso do sequenciamento genético, outras técnicas moleculares já foram utilizadas para diferenciação de *Babesia* spp., como a técnica molecular de análise por fragmentos produzidos por enzimas de restrição (RFLP), que foram utilizadas no trabalho de Jefferies *et al.*, (2007) para realizar a identificação das espécies em *B. vogeli*, *B. canis* e *B. gibsoni*. Ressaltando que no caso de técnicas como RFLP e Nested, o uso dos *amplicons*, ou seja, as moléculas de DNA amplificadas deve haver um cuidado quanto a contaminação ambiental por seres moléculas mais estáveis comparadas ao DNA/RNA (CARR *et al.*, 2010). Além disso, existe uma limitação no conhecimento relacionado as enzimas de restrição específicas, que serão utilizadas, podendo dificultar a utilização da técnica.

Para finalizar, um outro gene, de proteína adesiva ligada a trombospondin (BgTRAP), também pode ser utilizado para detecção de *Babesia* spp. (LEE *et al.*, 2009) com a detecção de *B. gibsoni*. Esta proteína foi detectada inicialmente em *Plasmodium* sp. (TROTTEIN; TRIGLIA; COWMAN, 1995) e mais adiante detectado em agentes do filo Apicomplexa. (GAFFAR, 2004).

## 2.11 Georreferenciamento e análise espacial

A cartografia como ferramenta a concatenar com a epidemiologia emerge no século XIX, quando John Snow associou mapas da cidade, observando o curso de distribuição da água com casos de cólera (SNOW, 1965) respondendo a síntese anteriormente proposta por Hipócrates que, já em meados do século V a.C, reunia diferentes recursos em busca de explicações racionais ao processo saúde-doença (CAIRUS; RIBEIRO JR., 2005).

A utilização de ferramentas de Sistema de posicionamento global, conhecida pela sigla GPS, do inglês “Global Positioning System”, vem sendo usada há anos para realização de

análises epidemiológicas, e são baseadas no uso dos dados do sistema de informações geográficas (GIS) associados a programas dos mais diversos que podem correlacionar tanto dados qualitativos quanto quantitativos (MENEZES.; FERNANDES, 2013), e contribuíram com a implementação de medidas preventivas na vigilância em saúde na atenção básica (SANTOS; NOUR, 2017), além de agregar informações aos estudos epidemiológicos relacionados à doenças zoonóticas (CONNOR *et al.*, 1997).

A análise espacial contribuiu na agregação de conhecimentos a respeito do espaço territorial ao qual um agravo em saúde pode estar inserido (NARDI *et al.*, 2013). Tal potencial está relacionado ao baixo custo da técnica e a viabilidade da composição de inúmeras variáveis estatísticas em conjunto a imagens zoonóticas, como os mapas temáticos (LONGLEY; GOODCHILD, 2020). Esta ferramenta é iniciada com o levantamento e o processamento de dados por meio de programas especializados, que viabilizam as operações, tais como interpolações e sobreposição de dados gerando, de uma forma eficiente e barata, diversas informações importantes, como focos de calor, relevo, entre outras (OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza a o sistema GIS para análise de dados estatísticos em conjunto com programas de prevenção e controle de doenças, analisando dados de recursos naturais, população, tendências demográficas, identificação de padrões espaciais e distribuição de eventos no espaço-tempo, favorecendo a obtenção de informações e tomadas de decisões (WHO, 2019).

Atualmente, diversos estudos epidemiológicos no ramo da Medicina Veterinária, que utilizam a análise espacial, podem ser encontrados como ferramenta para o mapeamento de exposição a diversos fatores, como análise de áreas de risco, controle e vigilância leishmaniose visceral (BARBOSA *et al.*, 2014); estudos randomizados utilizando ferramenta de análise espacial de soroprevalência para leishmaniose em animais domiciliados e seus tutores (BENITEZ *et al.*, 2018); acompanhamento de cobertura de campanhas vacinais contra raiva (SÁNCHEZ-SORIANO *et al.*, 2019); relação entre incidência de ataques de cães a seres humanos e condições socioeconômicas (RAGHAVAN; MARTENS; BURCHILL, 2014).

O geoprocessamento pode ser entendido como um conjunto de conhecimentos e técnicas computacionais para o tratamento de informações geográficas (CAMARA, MEDEIROS, 1998). Considerando-se a análise de pontos individualmente, como ocorre em mapas de pontos simples, alguns poderiam se sobrepor, tornando seu entendimento mais difícil quando são exibidos simultaneamente (ESRI,2016). Por isso, existem diversos métodos para estimar a intensidade por meio de técnicas de interpolação, como Krigagem, superfície de tendência, modelos locais de regressão e estimador Kernel (WEBER; WOLLMANN, 2016; SANTOS *et al.*, 2012).

Na ocorrência de sobreposições de pontos, o estimador de Kernel, mapa de calor no software livre QGIS, torna-se mais apropriado para expor os pontos individuais, além de ser para casos de exposição de regiões menos fragmentadas em determinado evento (WEBER; WOLLMANN, 2016). As cores usadas no mapa de Kernel são selecionadas conforme a categorização inserida e irão representar, de forma mais clara, através da intensidade de cor apresentada (CAMARA; MEDEIROS, 1998) .Outra vantagem do estimador de Kernel sob pontos simples, está relacionada a sobreposição dos pontos em que a intensidade irá evidenciar locais que poderiam não ficar claros quando ao resultado devido (ESRI, 2016), eliminando a possibilidade de algum evento não ser interpretado dentre tantos outros.

Outros trabalhos, relacionados a doenças transmitidas por carrapatos, foi realizado por Zhang *et al.*, (2019), utilizando mapas de pontos para identificar áreas com a presença de carrapatos. Enquanto os autores e Mrljak *et al.*, (2017) trabalharam com a demonstração de doenças em cães confeccionando mapas de Kernel, para demonstrar o panorama das patologias nas regiões de estudo

Não existem estudos geoespaciais epidemiológicos realizados com hemoprotozoários do gênero *Babesia* spp no Brasil até o presente momento. Apesar de não ser uma doença de importância zoonótica, apresenta uma grande importância econômica dentre as hemoparasitoses veterinárias, podendo causar sinais clínicos brandos a graves em cães infectados pelo parasito. Além disso, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE existem registros de um aumento no número de cães domiciliados ao longo dos anos e o último censo confere o número de 52,2 milhões de cães no Brasil (IBGE, 2013), tornando então fundamental a contínua pesquisa a respeito destas doenças a fim de preveni-las.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) sob número 3915240616.

#### 3.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas no período de 12 meses em quatro municípios localizados no estado do Rio de Janeiro, Brasil, com diferentes gradientes de altitude entre eles. A amostragem foi não probabilística, por conveniência. Os locais selecionados foram os municípios de Paracambi, situado na região metropolitana conhecida como Vale do Café, com média de 100m de altitude, situado geograficamente à Latitude: -22.6114 e Longitude: -43.7095; também pertencente à baixada fluminense, Barra do Piraí, município localizado no Vale do Paraíba, com média de 363m e situado geograficamente - Latitude: -22.4705 e Longitude: -43.8268.

Os outros dois municípios, localizados nas regiões serranas do Rio de Janeiro, foram Petrópolis e Teresópolis. Petrópolis é um município localizado na região metropolitana do estado, também conhecido como cidade Imperial, apresenta altitude média de 838m e está localizada geograficamente a Latitude: -22.5046, Longitude: -43.1823. Teresópolis é um município do interior norte do estado, considerada a cidade mais alta do estado, com média de 875m de altitude, com Latitude: -22.4123, Longitude: -42.9664 (Figura 2).

As coordenadas geográficas foram colocadas no formato decimal, uma vez que foi o padrão inserido na elaboração de mapas temáticos no software QGIS 3.10 (2019).

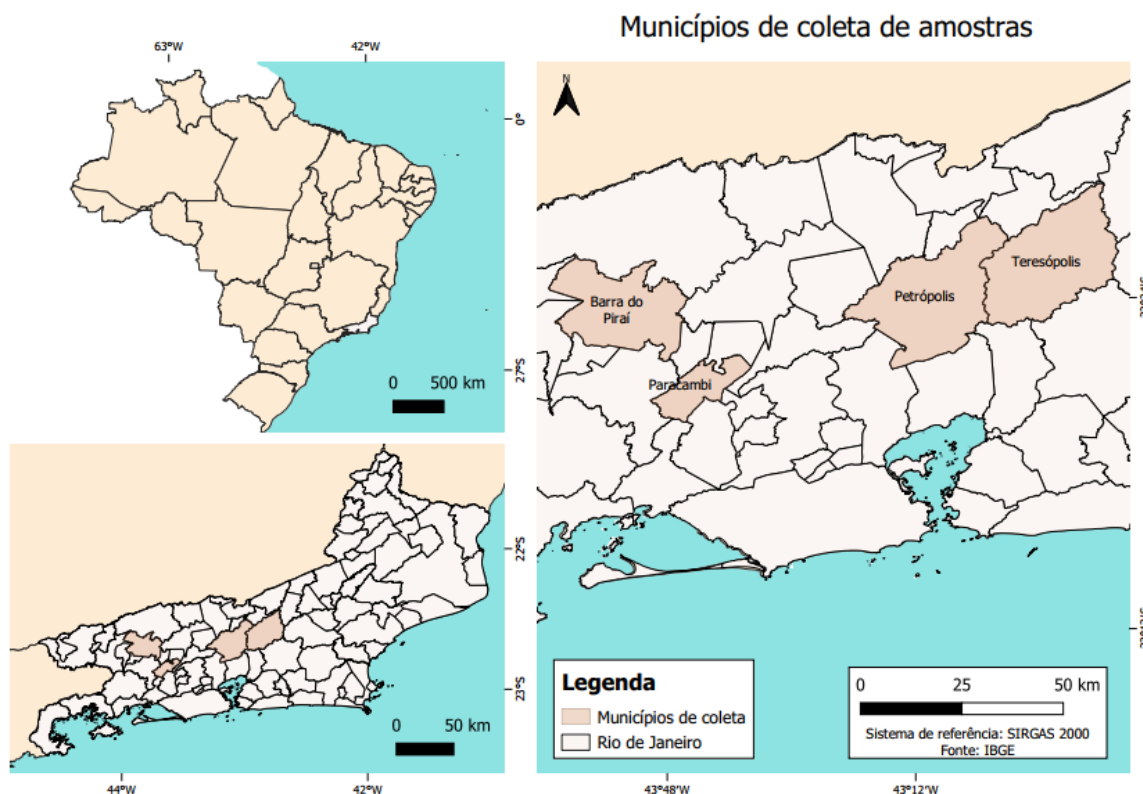


Figura 2 - Mapa de localização das coletas realizadas de Novembro de 2018 a Outubro de 2019. Canto esquerdo superior – Mapa do Brasil; canto esquerda inferior: mapa do estado do Rio de Janeiro. A direita: Mapa dos municípios de coleta. Sistema de Referência SIRGAS 2000. Fonte: IBGE.

As coletas foram realizadas em áreas rurais e urbanas de cada município, conforme as características do local (IBGE, 2017). As áreas urbanas foram caracterizadas pela presença de ruas asfaltadas e comércios e as áreas rurais pela presença de estradas de terra e forte presença agropecuária.

### 3.2 Amostragem

Foi estipulada uma prevalência de 50% para a seleção do tamanho amostral, estabelecendo um grau de confiança de 95% e 5% de precisão (Thrusfield, 2007). O cálculo foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$N = 1,96^2 \times P_{esp} \times \frac{(1 - P_{esp})}{d^2}$$

As amostras foram coletadas de forma randomizada, esperando-se obter no mínimo 384 cães ao todo, divididos entre os quatro municípios estudados em no período de um ano (Novembro/2018 a Outubro/2019), estabelecendo uma visita em cada município por mês. Todos os cães eram domiciliados e seus tutores aceitaram participar da pesquisa voluntariamente, após assinarem um termo de consento livre esclarecido. Os cães participantes foram selecionados ao acaso, sem combinação prévia. No momento de chegada aos municípios, tanto nas áreas rurais como nas áreas urbanas era ofertada à participação voluntária ao projeto. Ao final do tempo previsto de 12 meses, foram aplicados 456 questionários semi-estruturados na forma de entrevista para cada tutor, seguido de coleta de sangue de um cão por residência (Figura 3).

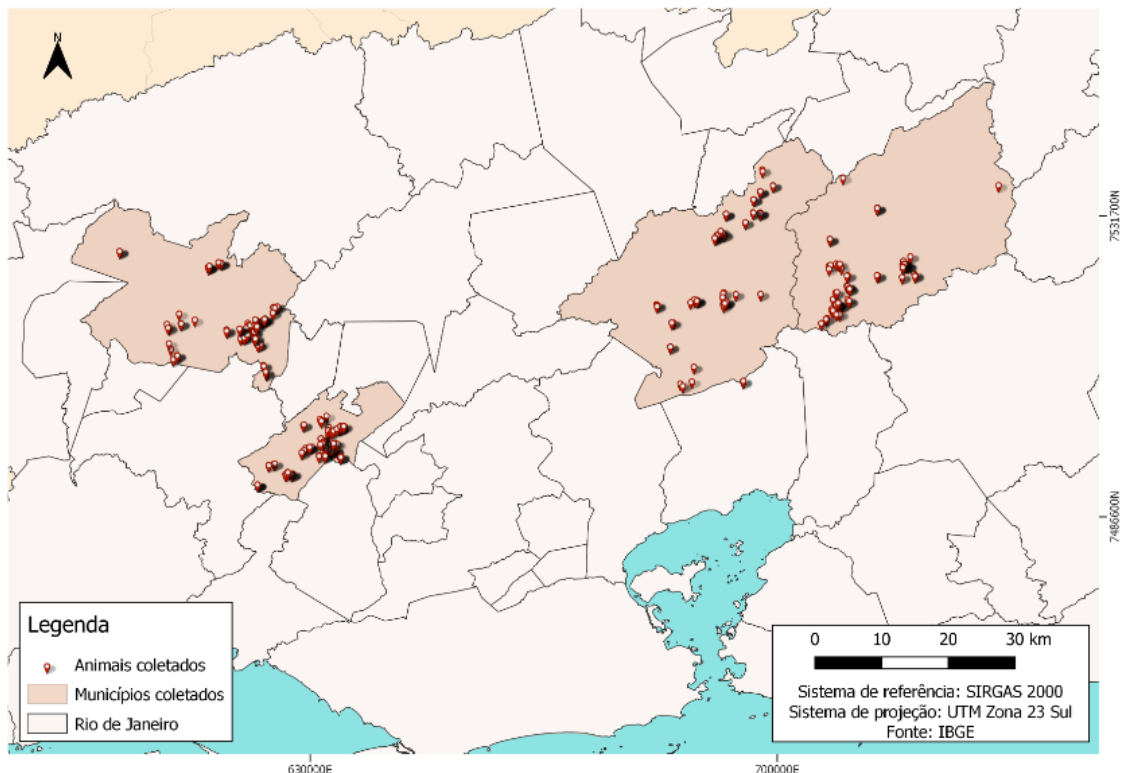


Figura 3 - Mapa temático demonstra a distribuição geográfica dos 456 pontos de coleta de dados epidemiológicos por entrevista e sangue de cães, para a detecção do alvo *18S rRNA* de *Babesia vogeli* em sangue de cães domiciliados de quatro municípios de duas regiões com diferentes altitudes (abaixo de 600m e acima de 600m).

### 3.4 Questionário epidemiológico semiestruturado

Foi aplicado um questionário epidemiológico semiestruturado (SANTOS et al., 2013) para cada tutor participante. Os bairros foram selecionados aleatoriamente e os domicílios por conveniência (já que não havia uma informação prévia de domicílios que possuíam cães na região). Foi amostrado apenas um cão por domicílio e em casas que apresentassem mais de um animal, a seleção foi feita por conveniência, sem estado sanitário previsto, sendo excluída a participação de filhotes abaixo de um mês. Todas as questões aplicadas de forma estruturada.

As variáveis exploradas foram subdivididas em inerentes a localidade de coleta - municípios de coleta (Barra do Pirai, Paracambi, Petrópolis ou Teresópolis), região em que reside (baixada ou serrana), zona que reside (urbana ou rural), estação do ano (inverno, outono, primavera ou verão), período (chuvoso ou seco), temperatura média do dia da coleta por município, separadamente (abaixo de 25°C ou acima); inerentes a propriedade - número de animais na propriedade (um ou mais), presença de outros animais domésticos (sim ou não), presença de animais silvestres (sim ou não), presença de algum tipo de vegetação no domicílio (sim ou não); e inerentes ao animal: assistência veterinária (sim ou não), sexo (macho ou fêmea), idade (<5 ou ≥ 5 anos), raça (sem raça definida ou com raça definida), pêlo (Curto ou Longo), escore corporal (satisfatório ou insatisfatório), porte (abaixo de 15Kg ou acima de 15Kg), Castração (sim ou não), acesso - a ambientes fora da propriedade: (sim ou não), se o cão já teve doença do carrapato (sim ou não), presença de carrapato no dia da coleta (sim ou não), espécie (*Rhipicephalus sanguineus* s.l. ou outra), uso de ectoparasiticidas (sim ou não). Também foi coletado o nome do produto utilizado e avaliado o estado sanitário do animal, por exame físico feito no momento da coleta com avaliação de frequência cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar e temperatura, além do escore corporal, este conforme Laflamme (1997) (abaixo ou acima do normal).

Também foi possível realizar um trabalho extensionista, por meio de informações sobre a condição social e econômica dos entrevistados e o conhecimento destas pessoas sobre doenças transmitidas por carrapatos para o entendimento da população participante e como este pode variar quando estão relacionados com transmissão de doenças por carrapatos, para o homem e para os animais, conforme a situação financeira e grau de escolaridade do entrevistado. Todas as dúvidas que surgissem a respeito de doenças transmitidas por carrapatos durante as entrevistas foram esclarecidas a fim de promover um trabalho educativo de prevenção para os voluntários participantes.

### 3.5 Coleta de sangue e carrapatos

As amostras de sangue total de cada cão foram obtidas por punção venosa da veia cefálica ou jugular (2 mL) e armazenadas em tubo contendo ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) como anticoagulante. O material foi acondicionado em isopor com gelo até a chegada no laboratório. O sangue total foi alíquotado em microtubos livres de RNases e DNases, em um volume de 200 µL e armazenado em freezer a -20 ° C. Uma alíquota de cada amostra de sangue foi para extração imediata de DNA.

Espécimes de carrapatos apresentando variáveis estágios de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) foram coletados tanto dos cães estudados, quanto do ambiente em que passavam a maior parte do tempo, como canis, casinhas e caminhas de pano. Os espécimes foram colocados em tubos de vidro fechados com algodão e armazenados em isopor com gelo, e acondicionados em geladeira no laboratório até avaliação microscópica. No laboratório, os espécimes foram examinados em microscópio estereoscópio e identificados por meio da chave de identificação taxonômica descrita por Barros; Arzua; Bechara (2006) e Aragão; Fonseca (1961) As ninfas de *Amblyomma sculptum* foram identificadas através da



chave de identificação taxonômica descrita por Martins *et al.*, (2010) e as larvas de *Amblyomma sp.* foram identificadas apenas no nível de gênero.

### 3.6 Extração de DNA total e padronização das amostras

No laboratório o sangue foi homogeneizado vagarosamente e 200µL de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL livres de DNase e RNase, e posteriormente identificados. A extração foi realizada no Laboratório de Sanidade Sanidade Avícola e multiuso do DESP - LASAVE, no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com a utilização do kit PureLink Genomic DNA Mini Kit® (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante.

Após finalização do protocolo de extração, o DNA foi quantificado em Espectrofotômetro NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) utilizando 3µL da solução extraída e as amostras cuja concentração ultrapassou 100ng/ul foram diluídas para esta concentração. Para visualizar a integridade do DNA extraído foi utilizado 5 µL das amostras extraídas e 1µL de tampão de corrida (6 X Gel Loading Dye - Sinapse Inc) submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% a 75V por 40 minutos (5V/cm<sup>2</sup>), como mostrado na Figura 4. Posteriormente, os géis foram corados em brometo de etídeo (0,4 mg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação E-Gel® Imager (Life Technology – ThermoFisher Scientific) (Figura 4). Garantida a integridade e a presença de DNA genômico, o material extraído foi alíquotado em microtubos de 1,5mL e armazenados no freezer a -20°C até a execução das reações em cadeia da polimerase (PCR).

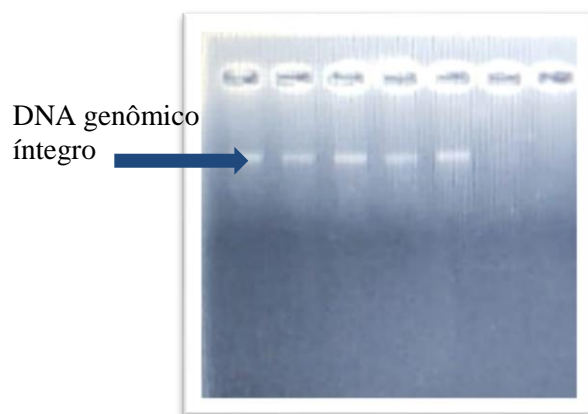


Figura 4 - Gel de Agarose 1% demonstrando a integridade do DNA genômico extraído de amostra de sangue de cães, visualizado sob luz ultravioleta em sistema de foto documentação. Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.7 Determinação do controle positivo e negativo

O controle padrão positivo foi obtido a partir do sangue de um cão positivo e sintomático para *Babesia sp.*, diagnosticado por visualização microscópica das formas de merozoítos intraeritrocíticos em esfregaço sanguíneo. Esta amostra foi extraída com PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A confirmação da presença de *Babesia sp.* na amostra foi realizada por PCR específico direcionado à proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*) e a sequência foi depositada no GenBank com o número de acesso MF459002 (PAULINO *et al.*, 2018). O controle padrão negativo foi estabelecido com a amostra de um cão com teste negativo em duas técnicas de PCR, direcionadas às sequências de *hsp70* e 18S rRNA (PAULINO *et al.*, 2018). A água ultrapura para PCR, livres de DNases e RNases, também foi utilizada como controle negativo de amplificação.

### 3.8 Detecção molecular de hemoparasitos da ordem Piroplasmida

As 456 amostras foram submetidas à técnica de Nested PCR (nPCR) conforme descrito por Jefferies et al. (2007) e modificado por Inácio et al. (2018) com o alvo na sequência 18S rRNA para detecção de hemoparasitos da ordem Piroplasmida.

Na primeira reação, a sequência dos oligoiniciadores utilizadas foram BTF1 (externa) 5' - GGCTCATTACAACAGTTATAG - 3' e BTR1 (externa) 5' - CCCAAAGACTTTGATT TCTCTC-3' que amplificam uma sequência de 930pb. Na segunda reação os oligoiniciadores utilizados foram uBTF2 (interna) 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC-3' e BTR2 (interna) 5'-GGACTACGACGGTATCTGATCG-3' que amplificam um fragmento de 800pb da sequência 18S rRNA.

O volume final de ambas as reações foi de 25 µL, contendo: tampão PCR 1x, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTP; 0,5 µM de cada primer, 1,0 U de Taq e 100 ng de DNA total. Na segunda etapa a concentração de magnésio foi modificada para 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e, além disso, 2 µL do produto amplificado da primeira etapa foi adicionado a segunda. As condições da termociclagem da primeira etapa do nPCR foram: 94 °C por 30 segundos inicialmente, seguido por 45 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, finalizado com 72 °C por 3 minutos. Todas as condições foram semelhantes na segunda etapa, exceto a temperatura de anelamento, que foi modificada para 62 °C por 30 segundos. As reações foram realizadas no termociclador ProFlex (Applied Biosystems - ThermoFisher Scientific). Os produtos da Nested-PCR foram revelados pela técnica de eletroforese em gel de agaroses (2%) e corados por Brometo de etídio (0,4 mg / mL). Os produtos foram visualizados sob luz ultravioleta no equipamento E-Gel Imager Camera (Life Technology - ThermoFisher Scientific). Todas as reações foram realizadas no Laboratório Multiuso LASAVE no Instituto de Veterinária da UFRRJ.

### 3.9 Limites de detecção

Foi determinado o limite de detecção para ambas as etapas das reações de nPCR. Os produtos da primeira e da segunda reação foram purificados por Wizard<sup>®</sup> SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, cada produto foi quantificado pelo ensaio fluorométrico Qubit<sup>™</sup> dsDNA BR (Invitrogen<sup>™</sup>). A partir da concentração obtida foi calculada a base de estimativa para o número de cópias de DNA. Para determinar o número de cópias de cada ponto de diluição, a seguinte equação foi usada:

$$\text{Número de cópias} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ (cópias por mol)} \times [\text{DNA}](\text{g})}{\text{tamanho do "amplicon" de PCR (pares de base)} \times 660 \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \left( \frac{\text{bp}}{\text{mol}} \right)}$$

Na sequência, diluições decimais em série de 10<sup>6</sup> até 10<sup>-1</sup> foram submetidas às reações de nPCR e observado em gel de agarose após a eletroforese (Figura 5).

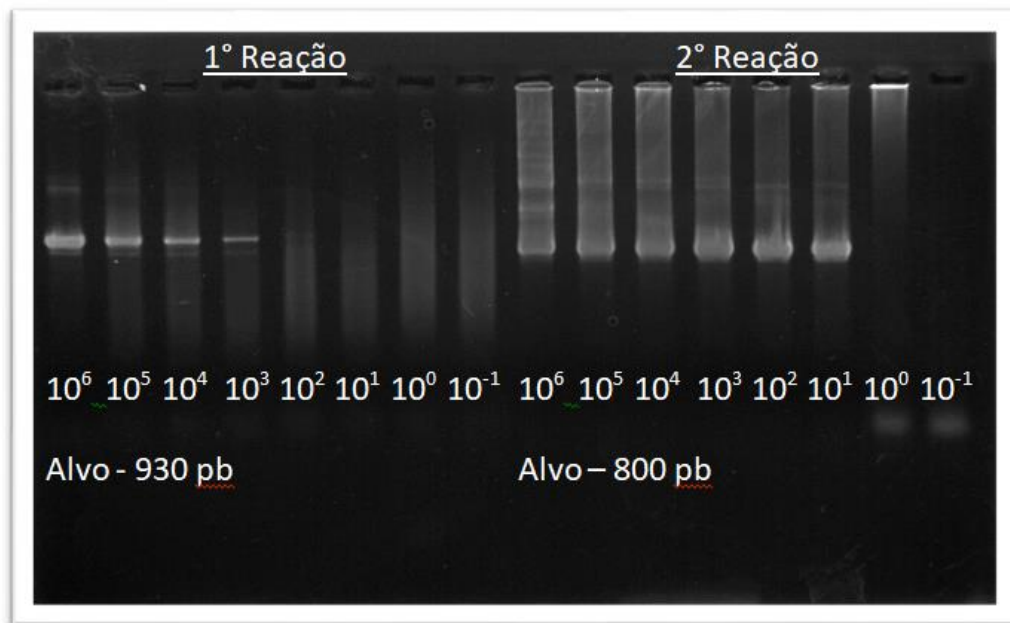


Figura 5 - Gel de Agarose 2% corado com Brometo de etídeo demonstrando o limite de detecção da primeira e da segunda reação de Nested PCR para o alvo *18S rDNA* de parasitos da ordem Piroplasmida. A primeira reação apresentou limite de detecção de  $10^3$  cópias e na segunda até  $10^1$ .

### 3.10 Cuidados para evitar contaminação

A técnica de Nested PCR é altamente sensível e específica, contudo, esta técnica apresenta um maior risco de contaminação em relação a técnica convencional (CARR, WILLIAMS, HAYDEN, 2010). Sabendo disso, foi necessária a realização de alguns cuidados para evitar a contaminação como: o preparo do mix das duas reações ocorreu em fluxo laminar horizontal Filterflux devidamente higienizado e esterilizado com álcool 70% e submetido a luz UV por 30 minutos. A pipetagem de amostras e controles seguiu uma ordem padrão em todas as reações, iniciando pelo controle negativo, seguido pelo DNA das amostras e posteriormente o controle positivo. Todas estas etapas foram realizadas em outra capela separada, tratada previamente com luz UV e posterior desinfecção utilizando álcool 70% e novamente luz UV por 30 minutos.

Após finalização da 1<sup>o</sup> reação, o produto retirado do termociclador foi pipetado, de forma cuidadosa no mix da segunda reação em uma sala separada. A pipetagem também seguiu a ordem padronizada da primeira reação e o controle negativo foi mantido e colocado no segundo mix, juntamente com os outros produtos amplificados. Os cuidados, principalmente em relação a abertura dos tubos contendo o produto de PCR, devem ser categóricos, pois evita que gotículas de “amplicons” se espalhem na sala e contamine futuras reações.

### 3.11 Purificação dos produtos e sequenciamento

Os produtos de PCR que apresentaram bandas na altura de 800 pb (positivos) foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante e sequenciados pelo método Sanger. O sequenciamento foi realizado com os “primers” da segunda reação de nPCR (INÁCIO *et al.*, 2019). O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

### 3.12 Análise filogenética da sequência *18S rRNA*

A partir de um cromatograma gerado do sequenciamento foi realizada a “trimagem”, obtendo-se os “contigs” a partir das sequências sensu e anti-sensu. As sequências obtidas (n = 33) foram depositadas no Genbank sob os números de acesso MN823187 a MN823219. A similaridade das sequências foi avaliada por uma busca inicial com a ferramenta BLAST, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A distância evolutiva foi realizada com a matriz de distâncias, calculada com a utilização do software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). Entre as sequências com 100% identidade apenas uma foi inserida na análise filogenética. O banco de dados foi composto por 61 sequências *18S rRNA* de organismos da ordem Piroplasmida: *Babesia* spp; *Theileria* spp; *Rangelia vitalii* e *Cytauxzoon felis* de diversas partes do mundo. O alinhamento das sequências foi realizado com o algoritmo CLUSTAL W disponível no software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). A reconstrução filogenética foi estimada através do método de Máxima verossimilhança. A seleção do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi realizada pelo software jModelTest v2.1.9 (POSADA; CRANDALL, 1998). A distância entre pares foi calculada com o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I (TAMURA *et al.*, 2013). Para a análise de confiança dos grupos foi utilizado o teste “Bootstrap” com 1000 pseudoréplicas. A análise filogenética foi realizada no software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). Como “output” na análise filogenética foi utilizada a espécie *Cardiosporidium cionae* (EU052685).

### 3.13 Variabilidade genética da sequência 18S rRNA de *Babesia vogeli*

O algoritmo Clustal W foi usado para realizar o alinhamento para determinar a variabilidade genética das sequências 18S rRNA de *B. vogeli* disponíveis no Genbank. Apenas sequências maiores que 1600 bp foram utilizadas. Os sítios mais variáveis foram determinados pela análise da entropia do alinhamento, usando o software BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). Um segundo banco de dados foi construído apenas com sequências 18S rRNA de *B. vogeli* que continham a região V4 de diversas partes do mundo. Esse banco de dados foi utilizado para analisar se havia uma segregação entre as sequências 18S rRNA de *B. vogeli* em função da sua localização geográfica. Um total de 96 sequências de *B. vogeli* foram recuperadas no banco de dados Genbank. O alinhamento das sequências foi realizado com o algoritmo CLUSTAL W disponível no software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). A análise filogenética foi realizada conforme descrito anteriormente.

### 3.14 Análise estatística

Um banco de dados contendo variáveis independentes (variáveis extrínsecas e intrínsecas) e a variável dependente (cães positivos para *B. vogeli* na nPCR) foi construído em planilha do programa Office Excel. Inicialmente uma análise bivariada através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi realizada para avaliar os fatores associados ao resultado positivo de parasitos da ordem Piroplasmorida em cães. As análises estatísticas foram realizadas no pacote RStudio (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Cada uma das variáveis foi avaliada de forma independente, estabelecendo um nível significância de 5% no teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (THRUSFIELD, 2007). Todas as variáveis qualitativas foram organizadas de forma dicotômica. O modelo de regressão logística foi construído aplicando-se o Método Wald, com ponto de corte de 0,1 e incluiu variáveis com valor de  $p < 0,25$  na análise bivariada. A colinearidade foi verificada de acordo com Jessen; Menard, (1996), assumindo o valor de tolerância  $> 0,1$  e Fator de Inflação de Variância (VIF)  $< 10$ . Entre as variáveis altamente correlacionadas aquela de maior plausibilidade biológica foi mantida na análise de regressão logística múltipla. A precisão do modelo de regressão final foi estabelecida pelo teste de Hosmer-Lemeshow ( $p$ -valor  $> 0,05$ ).

### 3.15 Análise Espacial

Para construção dos mapas temáticos foi empregada a base cartográfica do estado do Rio de Janeiro disponível no banco de dados eletrônico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017). A confecção dos mapas dos municípios de coleta e altitudes utilizou arquivos do tipo “shapefile” (SHP), da base cartográfica do Rio de Janeiro na escala 1:25.000 (RJ25), obtidos no site do IBGE. Para o mapa de altitudes, foram utilizadas as curvas de nível e o limite dos estados do Brasil da base cartográfica na escala 1:1.000.000 (BCIM). Logo, os mapas do estado Rio de Janeiro mantiveram suas coordenadas em graus decimais, no Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas (SIRGAS, 2000), definidas previamente pelo IBGE.

Com o objetivo de melhorar a visualização dos mapas, as curvas de nível foram definidas no estilo graduado por Quebra Natural (Jenks), com cores variando de azul (menores altitudes) para o vermelho (maiores altitudes) (Figura 6) no software QGIS (versão 3.10.0) assim como todas as etapas aqui descritas. Para a elaboração dos mapas que apresentam os municípios de coleta foi necessária uma prévia organização dos pontos coletados com o GPS de navegação. Esses pontos foram transformados para o formato graus decimais, seguidos pela tabulação dos dados relacionados aos cães e das amostras com detecção positivo do gene 18SrRNA de piroplasma, salvas em arquivo de formato CSV (“Comma Separated Value”).

### Altitudes of Rio de Janeiro State

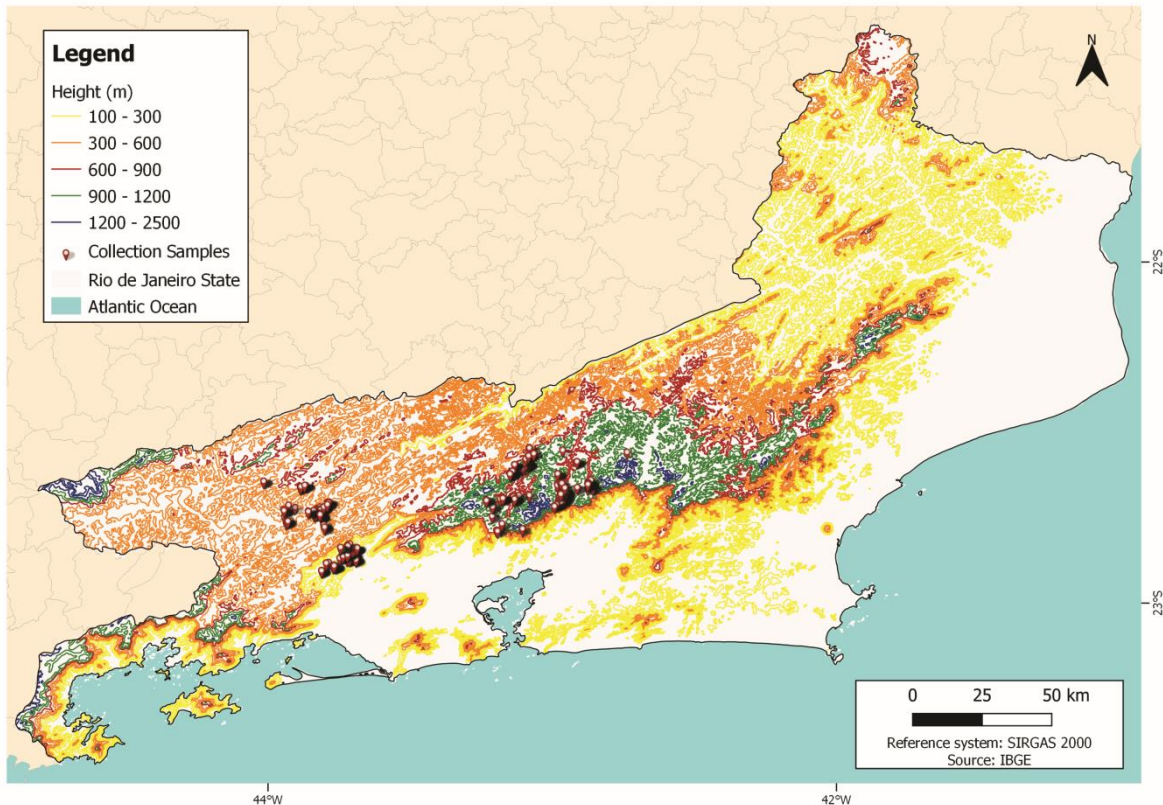


Figura 6 - Mapa de pontos associados aos diferentes gradientes de altitude que o estado do Rio de Janeiro do presente estudo, com curvas de nível estilo Jenks para melhor visualização.

Posteriormente, a tabela CSV foi importada para o ambiente SIG QGIS e salva como arquivo vetorial do tipo ponto no formato SHP. Todos os dados dos municípios de coleta foram inseridos no formato de georreferenciamento, zona Universal Transversa de Mercator (UTM) 23 Sul e a execução dos mapas descritos foram reprojatados para SIRGAS 2000 / UTM zona 23S. O arquivo “shapefile”, representado pelos pontos georreferenciados foram a base para geração dos mapas de densidade e, para isso, foi utilizado o estimador de densidade Kernel (WORTON, 1989), contido na ferramenta de interpolação Mapa de Calor do QGIS. A partir desta ferramenta, obteve-se um arquivo matricial (formato raster) contendo as regiões de concentração de casos positivos, que se destacaram com a escolha de um gradiente de cores categorizando-a em quatro classes de intervalos iguais.

Na análise de distribuição espacial foram empregados dois métodos. O primeiro para avaliar se os positivos obtidos estariam agregados ou dispersos aleatoriamente nos municípios estudados, além da inspeção visual dos mapas. Para tal, foi aplicada a interpolação de dados pelo método “Vizinho mais próximo” (do inglês: “Nearest-Neighbor Method”) – NN que permite inferir a real distribuição dos agravos. Após este processo, a fim de verificar a existência de autocorrelação espacial entre os cães positivos com a altitude, assim como em relação aos casos positivos e a existência de carrapatos no animal, foi aplicado o Índice de Moran, por meio do Indicador Local de Associação Espacial (LISA) (ANSELIN, 1995) variando de -1 a +1 e o valor de pseudo-significância (estabelecido com 999 permutações, com nível de significância de 5%) foram executados no software GeoDa™ 1.14 (2019).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Esquemas de coleta, prevalência e dados de positivos por município, zona e mês de coleta

O organograma abaixo (Figura 7) foi elaborado para favorecer o entendimento de como os eventos do projeto ocorreram. É possível observar que as coletas apresentaram uniformidade, tanto em relação a coleta por município, quanto por zona, assim como os percentuais de positividade por município e por zona.

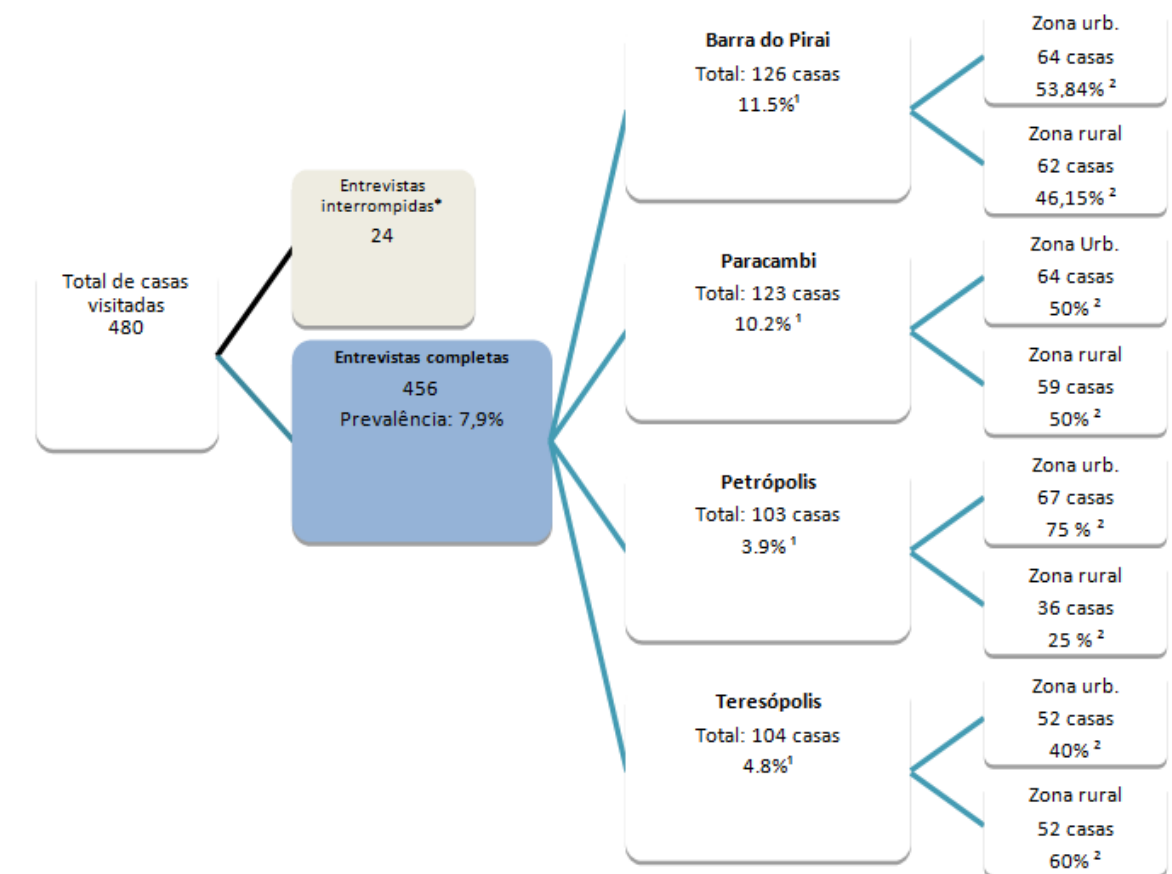


Figura 7 - Organograma demonstrando a sequência de eventos no processo de coleta de amostras de sangue de cães nos municípios de Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

\*Não foi possível a realização de coleta de amostras. <sup>1</sup> Percentual de amostras positivas na detecção da sequência *18SrRNA* de *Babesia vogeli* por município. <sup>2</sup> Percentual de amostras positivas para cada zona trabalhada.

A prevalência global de 7,9% (n = 36/456) de piroplasmídeos foi observada em cães domésticos em quatro municípios estudados no Estado do Rio de Janeiro. Em relação à prevalência conforme o local de estudo, o município de maior frequência de cães positivos para *B. vogeli* foi Paracambi, com 11,5% (n=14/122), seguido por Barra do Piraí com 10,2% (n=13/127). Esses dois municípios localizam-se abaixo de 600m de altitude, classificados como de baixa altitude. Os cães domiciliados em municípios de alta altitude ( $\geq 600$  m), Petrópolis e Teresópolis, apresentaram uma frequência de positividade de 3,9% (n=4/103) e 4,8% (n=5/104), respectivamente. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. e *Amblyomma sculptum*

foram as espécies de carrapatos identificados em cães domiciliados nos quatro municípios avaliados.

O gráfico 1 abaixo refere-se a distribuição numérica dos cães amostrados em relação ao percentual de positividade para *B. vogeli* durante o período de um ano (Figura 8):

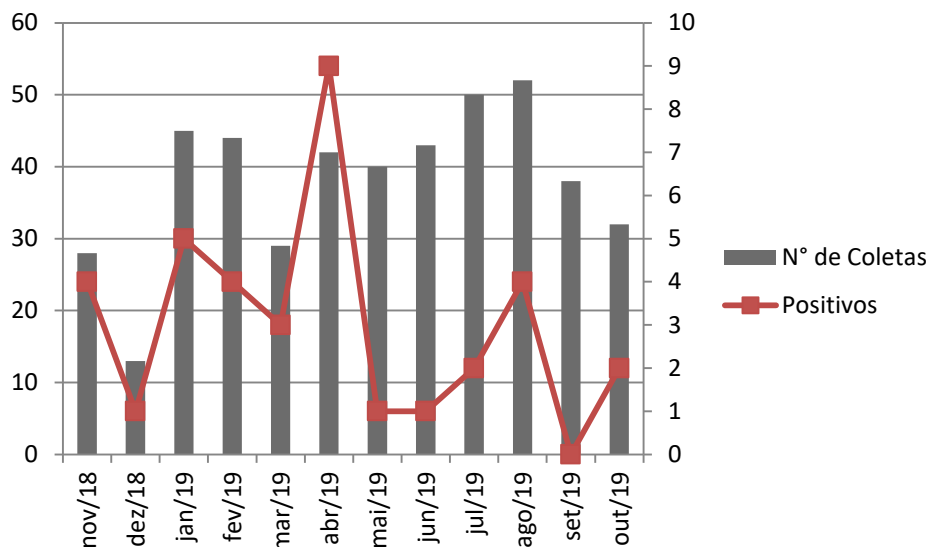


Figura 8 - Distribuição das amostras coletadas ao longo dos meses (eixo x) e detecções positivas da sequência *18S rDNA* de *Babesia vogeli* em um período de 12 meses de coleta (eixo y), de Novembro de 2018 a Outubro de 2019.

## 4.2 Análise filogenética e de variabilidade

Utilizando a ferramenta nBLAST, a análise da sequência *18S rRNA* das amostras deste estudo mostrou um percentual de identidade variando de 99,9% a 100% com isolados de *B. vogeli* depositados no GenBank. Em vista disso, por meio da análise filogenética as sequências obtidas neste trabalho foram agrupadas no clado de *B. vogeli*.

A análise de entropia do alinhamento entre as sequências de *18SrRNA* de *B. vogeli* (> 1600pb) revelou que a região mais variável corresponde à região hipervariável V4 (Figura 9). Os “primers” utilizados no presente estudo amplificam a região V4, sendo, portanto, os mais adequados para o estudo de diversidade genética.



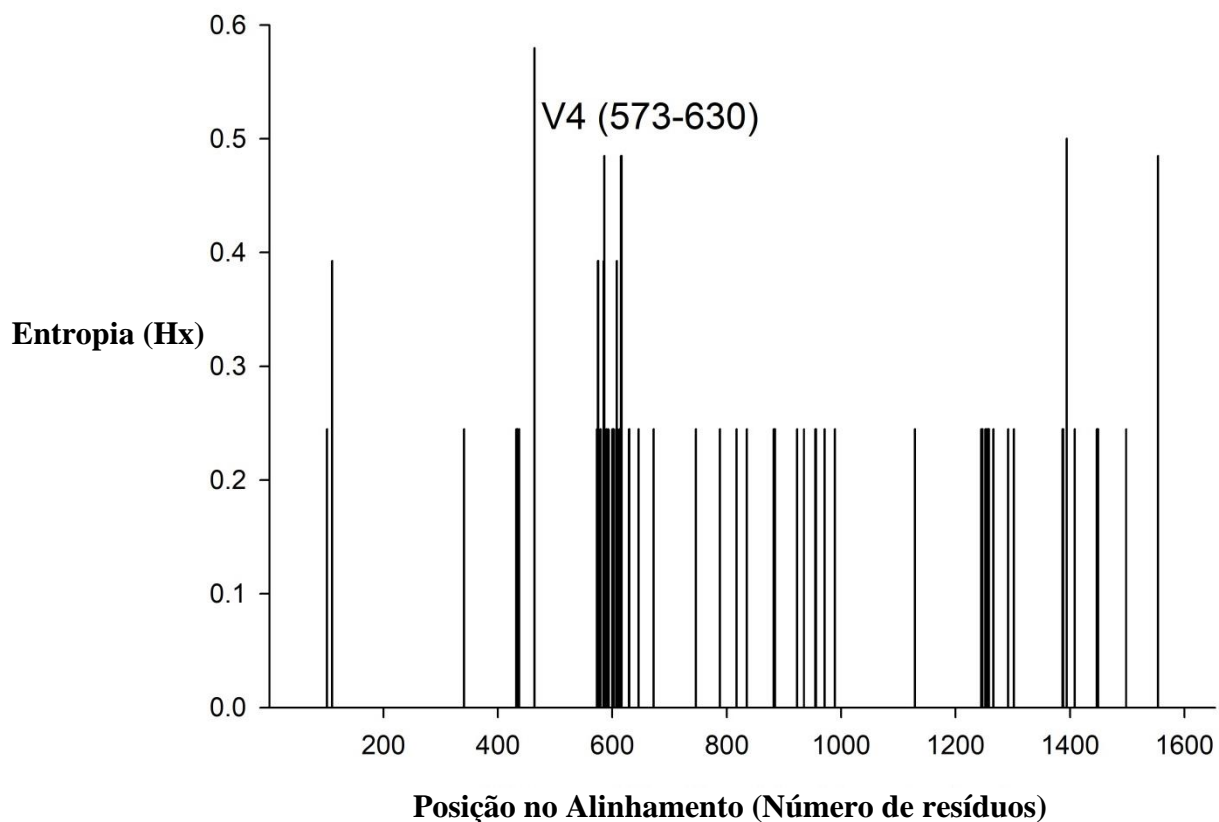


Figura 9 - Análise de entropia da sequência parcial *18S rRNA* de *Babesia vogeli* com 1600 nucleotídeos com foco na variação correspondente à região hipervariável V4.

Observando a matriz de distância evolutiva entre as 33 sequências obtidas neste estudo, observou-se homogeneidade genética entre as sequências *18S rRNA*, com valores de distância variando de 0 a 0,007 e valor médio de 0,001 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Distância evolutiva (distância-p) entre as sequências de *18S rRNA* de *Babesia vogeli* obtidas de cães naturalmente infectados em Paracambi, Barra do Pirai, Teresópolis e Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.



A distância evolutiva das sequências *18S rRNA* de cães naturalmente infectados foi maior no município de Teresópolis com valor médio de 0,0045, seguido de Barra do Piraí 0,0014 e Paracambi 0,0009. Todas as sequências obtidas de cães do município de Petrópolis foram idênticas. A distância evolutiva (0,003) foi maior entre as sequências dos municípios de Barra do Piraí (baixa altitude) e Teresópolis (alta altitude). Esses dados demonstram que em regiões de grande altitude há maior variabilidade na sequência *18S rRNA* de *B. vogeli* em relação a baixa altitude. Dentre as sequências obtidas, 12 sequências de Barra do Piraí, Paracambi e Teresópolis foram incluídas na análise filogenética por apresentarem percentual de identidade inferior a 100% entre elas. Quando se comparou as dez sequências de *B. vogeli* com as de outros países foi possível verificar uma alta similaridade entre as sequências desta espécie com outras sequências da América do Sul, América do Norte, Europa, África e Ásia (Figura 10).

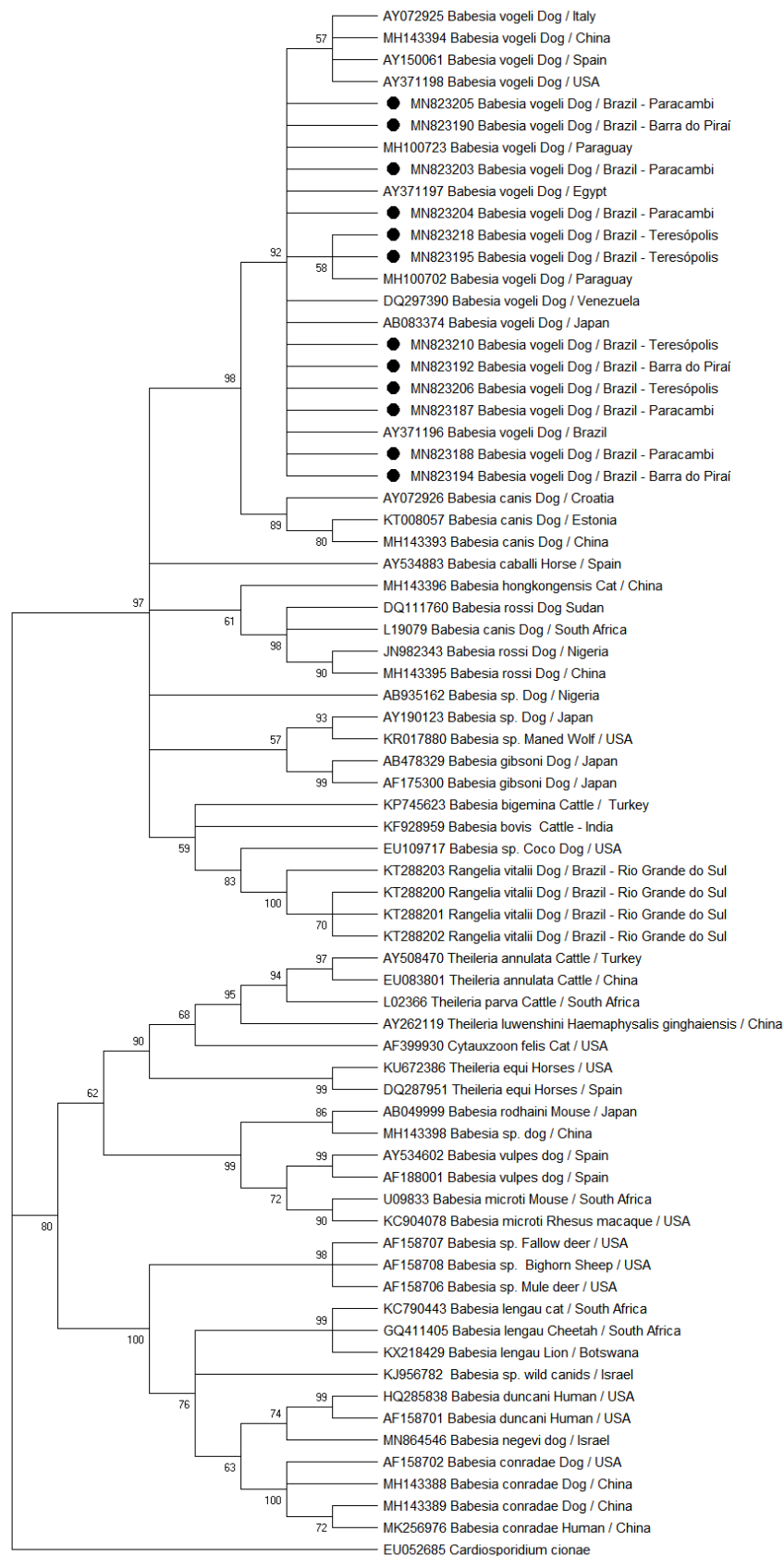


Figura 10 - Árvore filogenética, estimada pelo método de Máxima Verossimilhança a partir de sequências parciais 18S rRNA de *Babesia vogeli* e outras espécies do gênero *Babesia* spp., *Rangelia* sp., *Theileria* sp. e *Cytauxzoon felis*. Os números nas ramificações indicam o valor

do Bootstrap em 1000 réplicas. A sequência EU052685 de *Cardiosporidium cionae* foi usada como grupo externo.

Em relação a análise filogenética das sequências *18SrRNA* contendo a região hipervariável V4 de *B. vogeli* com sequências de outros países, esta não demonstrou segregação conforme as diferentes localizações geográficas (Figura 11).

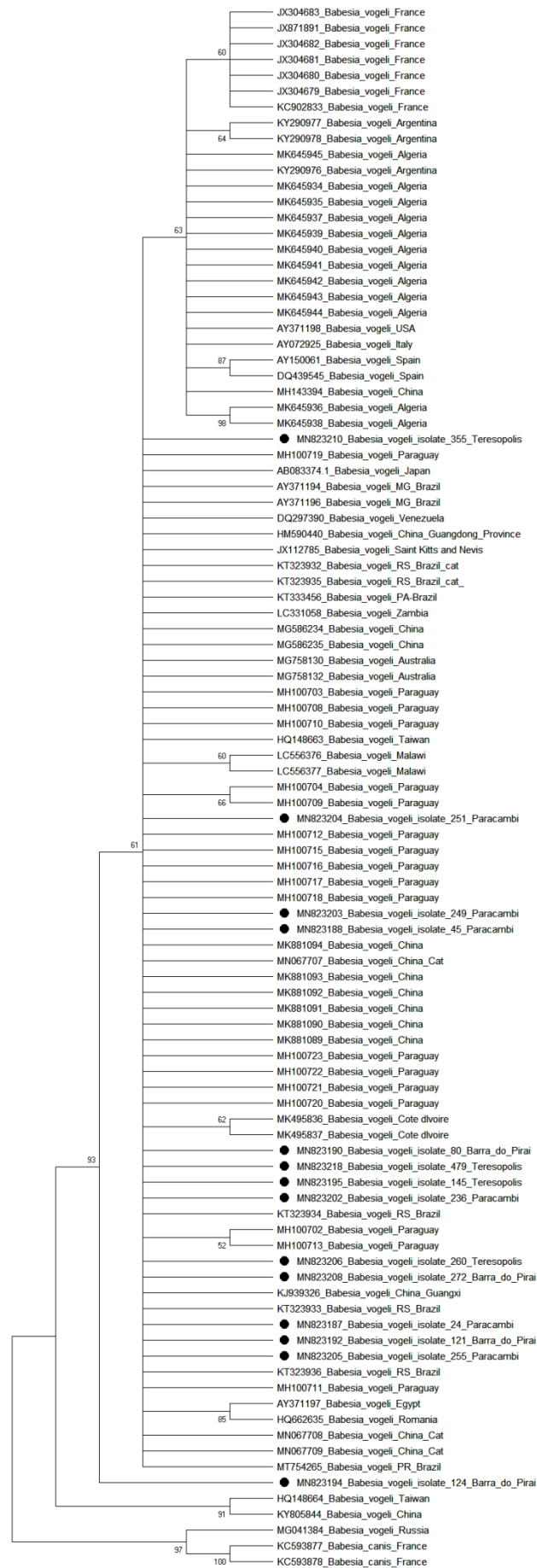


Figura 11 - Árvore filogenética estimada pelo método de Máxima Verossimilhança a partir de sequências parciais 18S rRNA de *Babesia vogeli* de diversas partes do mundo.

### 4.3 Análise estatística

Na análise univariada (Tabela 2) foi possível verificar alguns fatores ambientais associados com os casos positivos, tais como: baixa altitude ( $p = 0.007$ ), sazonalidade ( $p = 0.003$ ), animais sem abrigo ( $p = 0.014$ ), presença de carrapatos nos animais ( $p = 0.015$ ) e infestação por *R. sanguineus* s.l. ( $p = 0.003$ ).

Não apresentaram nenhuma associação com a positividade de *B. vogeli* as variáveis de município, zona, estação do ano, período do ano, temperatura, número de cães da casa, presença de outros animais domésticos ou animais silvestres. Assim como presença de vegetação na casa e acesso a diferentes ambientes também não mostraram significância neste estudo. A infestação por *A. sculptum* também não mostrou associação com cães positivos para *B. vogeli*, nem as variáveis de assistência veterinária e as condições de higiene do ambiente.

**Tabela 2** - Análise descritiva e bivariada dos fatores ambientais realizada pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em cães naturalmente infectados com *Babesia vogeli* nos municípios de Paracambi, Barra do Pirai (baixa altitude) e Petrópolis e Teresópolis (alta altitude) no estado do Rio de Janeiro. (Continua)

Fatores ambientais	Análise descritiva				Análise Univariada			
	N	N+	N-	%	$\chi^2$	P	OR	IC (95%)
<b>Municípios</b>								
Barra do Pirai	127	13	114	10.24%	6.75	0.8	-	-
Paracambi	122	14	108	11.47%				
Petrópolis	103	4	99	3.88%				
Teresópolis	104	5	99	4.80%				
<b>Altitude</b>								
≥ 600 m	249	27	222	10.8%	6.56	0.007	2.68	1.23-5.83
< 600 m	207	9	198	43.5%				
<b>Zona</b>								
Urbana	244	19	225	7.8%	0.008	0.53	-	0.49-1.91
Rural	212	17	195	8%				
<b>Estação do ano</b>								
Inverno	142	8	134	5.63%	2.66	0.45	-	-
Outono	125	10	115	8%				
Primavera	82	6	76	7.32%				
Verão	107	12	95	11.21%				
<b>Período do ano</b>								
Seca	283	14	269	4.95%	8.91	0.003	2.80	1.39-5.63
Chuva	173	22	151	12.72%				
<b>Temperatura</b>								
< 25°C	186	14	172	7.53%	0.06	0.48	-	0.54-2.19
≥ 25°C	270	22	248	8.15%				
<b>Número de cães na casa</b>								
Um	185	14	171	7.57%	0.05	0.49	-	0.54-2.17
Mais	270	22	248	8.15%				

Tabela 2. Continuação

<b>Presença de outros animais domésticos</b>									
Não	199	18	181	9.04%	0.64	0.26	-		0.38-1.50
Sim	257	18	239	7.53%					
<b>Presença de animais silvestres</b>									
Não	377	31	346	8.22%	0.32	0.38	-		0.50-3.52
Sim	79	5	74	6.33%					
<b>Presença de vegetação na casa</b>									
Não	138	11	127	7.97%	0.002	0.55	-		0.47-2.06
Sim	318	25	293	7.86%					
<b>Presença de abrigo</b>									
Não	180	21	159	11.66%	0.014	5.82	2.30		1.15-4.59
Sim	276	15	261	5.43%					
<b>Acesso a ambiente urbano</b>									
Não	259	20	239	7.72%	0.02	0.50	-		0.53-2.10
Sim	197	16	181	8.12%					
<b>Acesso a pasto</b>									
Não	297	25	272	9.19%	0.32	0.36	-		0.39-1.69
Sim	159	11	148	6.92%					
<b>Acesso a córrego</b>									
Não	308	25	283	8.12%	0.06	0.48	-		0.43-1.90
Sim	148	11	137	7.43%					
<b>Acesso a mata</b>									
Não	268	21	247	7.83%	0.003	0.54	-		0.51-2.03
Sim	188	15	173	7.98%					
<b>Presença de infestação por carrapato</b>									
Não	343	21	322	6.12%	5.98	0.01	2.35		1.16-4.73
Sim	113	15	98	13.27%					
<b>Infestação por <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.</b>									
Não	389	24	365	6.17%	10.83	0.003	3.39		1.57-7.01
Sim	67	55	12	17.91%					
<b>Infestação por <i>Amblyomma sculptum</i></b>									
Não	442	35	407	7.92%	0.01*	0.70	-		0.11-7.04
Sim	14	1	13	7.14%					
<b>Possui assistência veterinária</b>									
Não	228	20	208	8.8%	0.48	0.30	-		0.40-1.56
Sim	228	16	212	7%					
<b>Condições de Higiene</b>									
Satisfatória	305	25	280	8.19%	0.10	0.46	-		0.42-1.86
Insatisfatória	150	11	139	7.33%					

N: número de cães testados por qPCR; N +: Número de cães positivos; N-: Número de cães negativos; %: Percentual de cães positivos  $\chi^2$ : teste Qui-quadrado; \*: Teste Exato de Fisher; P: valor de p; IC: intervalo de confiança; OR: Odds Ratio.



Apresentada a significância em relação ao período do ano relacionado a época chuvosa no Rio de Janeiro, demonstrada na tabela 2, os dados de pluviosidade médio do estado foram associados ao número de cães positivos para *B. vogeli* e demonstrados na figura 12. Os dados de temperatura média mensal também foram analisados juntamente com os cães positivos para *B. vogeli* para a confecção do gráfico 3 (Figura 13).

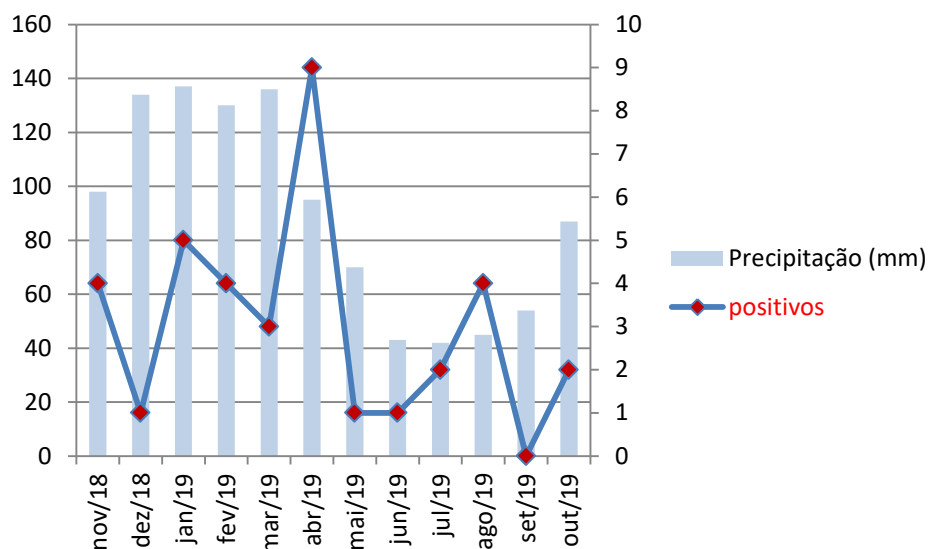


Figura 12 - Dados de pluviosidade média obtidos pelo site Climate.org dos meses de coleta de Novembro de 2018 a Outubro de 2019 (eixo x) do estado do Rio de Janeiro analisados em conjunto com os cães positivos na reação de nPCR a partir da sequência *18S rRNA* de *Babesia vogeli* (eixo y).

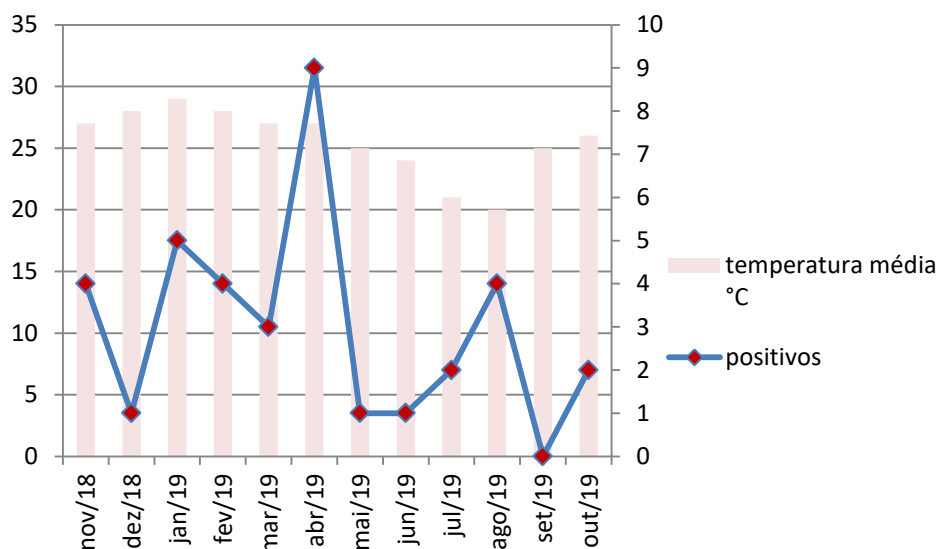


Figura 13 - Dados de temperatura média obtidos pelo site Climate.org dos meses de coleta de Novembro de 2018 a Outubro de 2019 (eixo x) analisados em conjunto com os cães positivos na reação de nPCR a partir da sequência *18S rRNA* de *Babesia vogeli* (eixo y).

É possível observar que tanto na análise estatística presente na tabela 2, quanto na demonstração gráfica, a temperatura não foi um fator associado com a positividade para *B. vogeli* na região estudada. O período chuvoso foi um fator associado com a infecção por *B.*

*vogeli* em cães, esse resultado foi observado tanto na análise estatística pelo teste de Qui-quadrado e também foi possível observar na figura 12.

Quanto as variáveis intrínsecas ao cão, nenhuma variável apresentou p-valor significante, como observado na Tabela 3.

**Tabela 3** - Análise descritiva e bivariada das características intrínsecas de cães calculada pelo Qui-quadrado ou exato de Fisher em cães naturalmente infectados por *Babesia vogeli* dos municípios de Paracambi, Barra do Piraí (baixa altitude) e Teresópolis, Petrópolis (alta altitude) no Estado do Rio de Janeiro.

Características intrínsecas	Análise descritiva				Análise Univariada			
	N	N+	N-	%	$\chi^2$	p-valor	OR	IC (95%)
<b>Sexo</b>								
Fêmea	233	18	215	7.7%	0.02	0.51	-	0.48-1.88
Macho	223	18	205	8%				
<b>Idade</b>								
> 5 anos	178	13	165	7.30%	0.14	0.43	-	0.56-2.32
≤ 5 anos	278	23	255	8.27%				
<b>Já apresentou alguma “doença do carrapato”?</b>								
Não	433	35	398	8.08%	0.42*	0.44	-	0.07-3.95
Sim	23	1	22	4.35%				
<b>Raça</b>								
Mestiço	305	26	279	8.52%	0.50	0.30	-	0.62-2.80
Puro	151	10	141	6.62%				
<b>Pelagem</b>								
Curta	263	23	240	8.74%	0.62	0.27	-	0.37-1.53
Longa	193	13	180	6.73%				
<b>Escore corporal</b>								
Insatisfatório	91	10	81	10.98%	1.50	0.16	-	0.75-3.47
Satisfatório	365	26	339	7.12%				
<b>Porte</b>								
<15 kg	314	28	286	8.91%	1.45	0.15	-	0.27-1.37
≥ 15 kg	142	8	134	5.63%				
<b>Castração</b>								
Não	343	28	315	8.16%	0.14	0.44	-	0.52-2.64
Sim	113	8	105	7.07%				
<b>Status sanitário</b>								
Assintomático	328	22	306	6.10%	2.27	0.10	-	0.84-3.45
Sintomático	128	14	114	10.9%				

N: número de cães testados por qPCR; N +: Número de cães positivos; N-: Número de cães negativos; %: Percentual de cães positivos  $\chi^2$ : teste Qui-quadrado; \*Teste Exato de Fisher; P: valor de p; IC: intervalo de confiança; OR: *Odds Ratio*.

As variáveis com valor de  $p \leq 0,20$  foram submetidas à análise de regressão logística: altitude, estação do ano, presença de carrapatos, estado sanitário do animal, infestação por *R.*

*sanguineus* s.l., escore corporal, porte do animal e presença de abrigo. No modelo final, as variáveis: baixa altitude, período chuvoso e infestação por *R. sanguineus* s.l. foram capazes de explicar 72,6% dos casos positivos para *B. vogeli* na região estudada (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise de regressão logística dos fatores associados com cães positivos para *Babesia vogeli* através da reação de Nested PCR em municípios de baixa e alta altitude do estado do Rio de Janeiro.

Variáveis	B	S.E	Wald	Df	Sig	OR	IC (95%)
<b>Altitude</b>							
≥ 600 m	0.83	0.41	4.14	1	0.04	2.29	1.03-5.07
<b>Período do Ano</b>							
Chuva	0.90	0.36	6.06	1	0.01	2.45	1.20-5.01
<b>Infestação por <i>Rhipicephalus sanguineus</i></b>							
Sim	0.91	0.40	5.22	1	0.02	2.47	1.14-5.38

B: estimativas dos parâmetros da equação; SE: erro padrão; Wald: estatística de Wald; df: graus de liberdade; Sig: significância da estatística de Wald; OR: Odds Ratio ; IC: intervalo de confiança..

#### 4.4 Análise espacial

Inicialmente um mapa temático de pontos referente aos casos positivos de *B. vogeli* em cães foi elaborado (Figura 14), que permitiu expor um panorama dos cães positivos em cada um dos quatro municípios estudados.

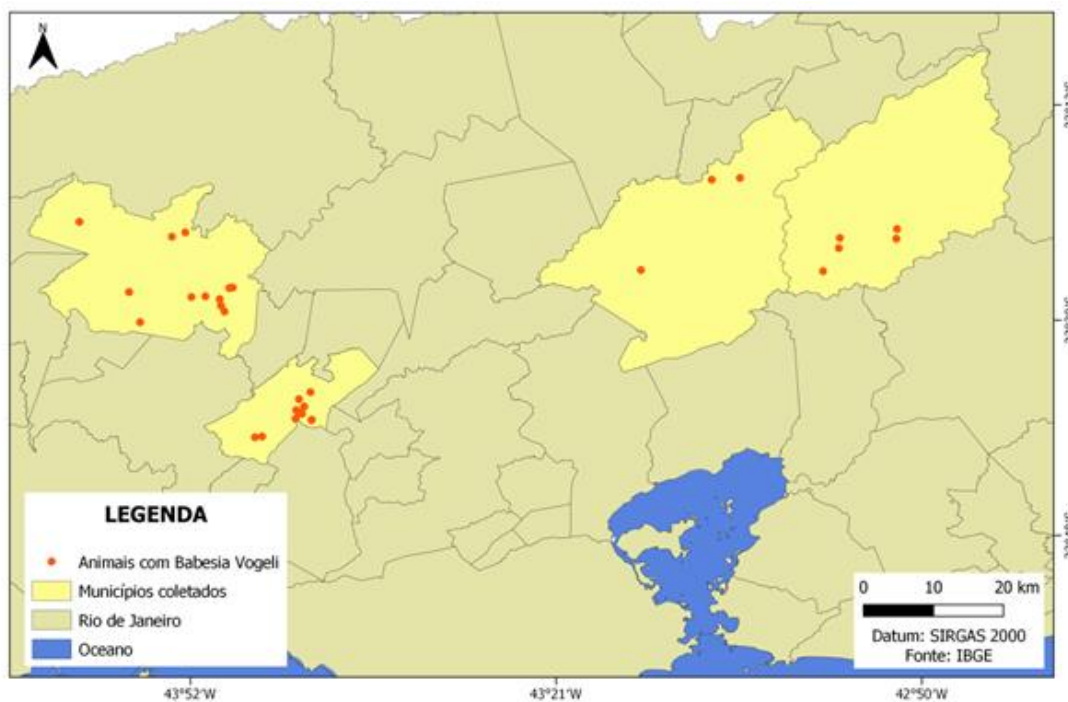


Figura 14 - Pontos de coleta com amostras positivas na detecção da sequência do *18S rRNA* de *Babesia vogeli* nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis - Rio de Janeiro, 2018-2019.

Conforme a interpolação discreta do Vizinho mais próximo (Nearest Neighbors Prediction Method - NN), a distribuição dos pontos de GPS coletados foi demonstrada através da tabela 5 abaixo.

**Tabela 5** - Distribuição dos pontos de coleta analisados no presente estudo realizado em quatro municípios de diferentes altitudes, no estado do Rio de Janeiro, no período de novembro de 2018 à outubro de 2019. Apresentação de dados interpolados pelo “Método do Vizinho Mais Próximo”.

	<b>NMO</b>	<b>NME</b>	<b>NNI</b>	<b>N</b>	<b>Z-score</b>
<b>BP</b>	0.0009	0.009	0.11	127	-19.13
<b>PB</b>	0.0007	0.005	0.14	122	-18.24
<b>Pet</b>	0.0006	0.01	0.06	103	-18.25
<b>Te</b>	0.003	0.01	0.26	104	-13.98

BP: Barra do Piraí, PB: Paracambi, Pet: Petrópolis e Te: Teresópolis. NMO: Distância mais próxima observada; NME: Distância mais próxima esperada; NNI: Índice de distância; Z-score – significância.

A partir da interpretação da significância do NN, pode-se afirmar que os dados da coleta, durante o projeto, foram classificados como agregados dentre os municípios estudados. No total foram visitados 22/50 bairros em Barra do Piraí, 16/27 bairros em Paracambi, 17/24 em Petrópolis e 21/49 em Teresópolis. A partir deste resultado, foi então calculado pelo método NN a relação de distribuição dos cães positivos (Tabela 6).

**Tabela 6** - Distribuição dos positivos na detecção da sequência do *18S rRNA* analisados no presente estudo realizado em quatro municípios de diferentes altitudes, no estado do Rio de Janeiro, no período de novembro de 2018 à outubro de 2019. Apresentação de dados interpolados pelo “Método do Vizinho Mais Próximo”.

	<b>NMO</b>	<b>NME</b>	<b>NNI</b>	<b>N</b>	<b>Z-score</b>
<b>BP</b>	0.01	0.02	0.62	13	-2.70
<b>PB</b>	0.005	0.009	0.51	14	-3.49
<b>Pet</b>	0.08	0.04	2.07	4	3.55
<b>Te</b>	0.04	0.02	1.90	5	3.45

BP: Barra do Piraí, PB: Paracambi, Pet: Petrópolis e Te: Teresópolis. NMO: Distância mais próxima observada; NME: Distância mais próxima esperada; NNI: Índice de distância; Z-score – significância.

Na Tabela 6 a NMO é a distância média dos vizinhos mais próximos dos nossos dados, enquanto a NME é a distância média esperada em uma situação de completa aleatoriedade espacial. Em Barra do Piraí e Paracambi a NME foi maior que a NMO, enquanto que o contrário ocorre em Petrópolis e Teresópolis. Sendo assim, é observado estatisticamente através do resultado NNI que os animais positivos para *B. vogeli* estão aglomerados em Barra do Piraí e Paracambi (resultado entre 0-1).

No caso o resultado de NNI, encontrado em Teresópolis, demonstra aleatoriedade em relação a positividade esperada, que estando acima de 2 pode indicar que é possível que exista uma regularidade de incidência de *B. vogeli*.

Em relação a distribuição, tanto em Petrópolis quanto em Teresópolis, não houve aglomeração. Visto a sobreposição de pontos obtidos no mapa de pontos acima apresentado e os resultados agregados observados no método do NN, foi aplicado o Mapa de Kernel (Figura 15) que permitiu uma melhor visualização da densidade geográfica dos casos positivos.

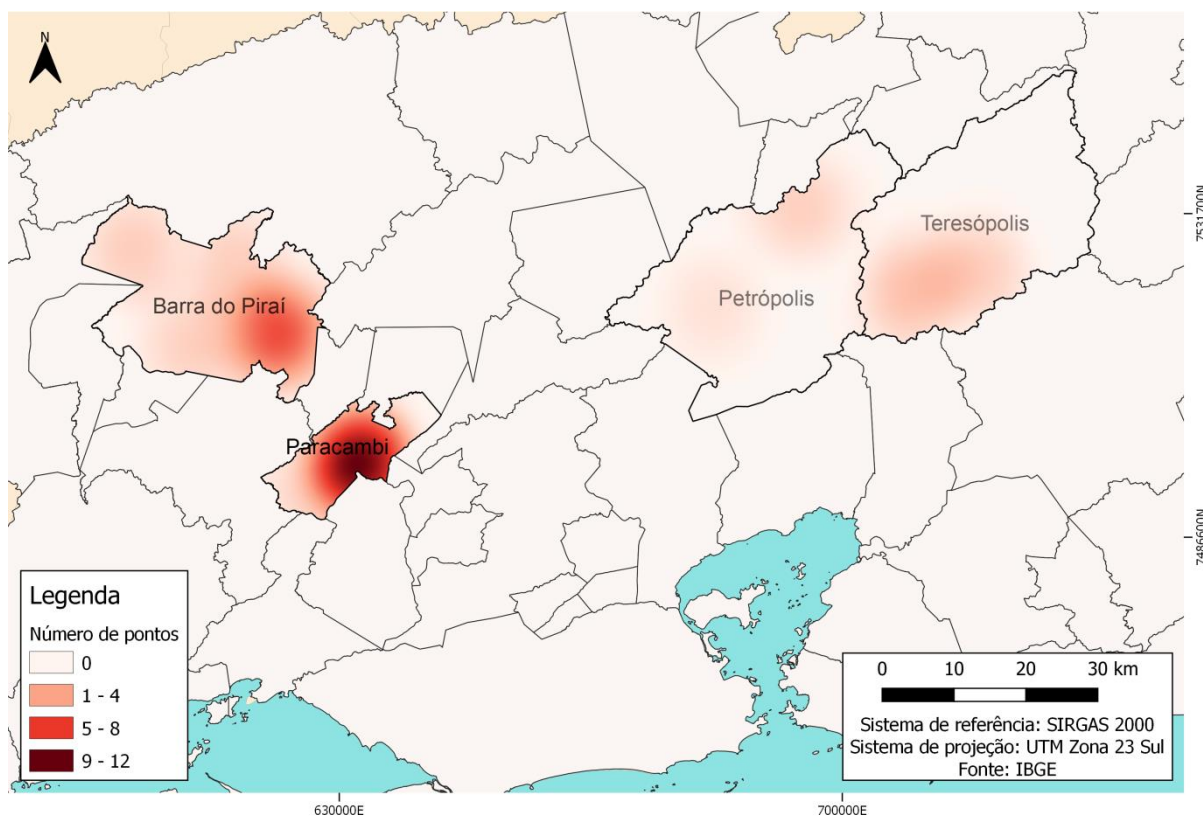


Figura 15 - Mapa de Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do 18S *rRNA* de *Babesia vogeli* em região de baixada e serrana do estado do Rio de Janeiro entre novembro de 2018 à outubro 2019.

Em relação à análise espacial, a o mapa Kernel mostrou a concentração dos casos positivos em cidades de baixa altitude (<600m) (Figura 15). Aplicado o Índice de Moran de Autocorrelação Espacial Local (LISA) em relação aos casos positivos versus a altitude, que resultou em um valor de Moran's I: 0,605 (Figura 16). Isso permitiu atribuir a presença de casos positivos com associação espacial em regiões mais baixas, principalmente no município de Paracambi que apresentou a maior concentração de pontos vermelhos no mapa de Cluster de correlação espacial (> 600 m) com - pseudo p-valor 0,001 mostrado na (Figura 17). Foi possível identificar pontos em azul demonstrando que em Barra do Pirai, Petrópolis e Teresópolis a altitude e os cães positivos para *B. vogeli* apresentaram baixa autocorrelação espacial entre vizinhos.

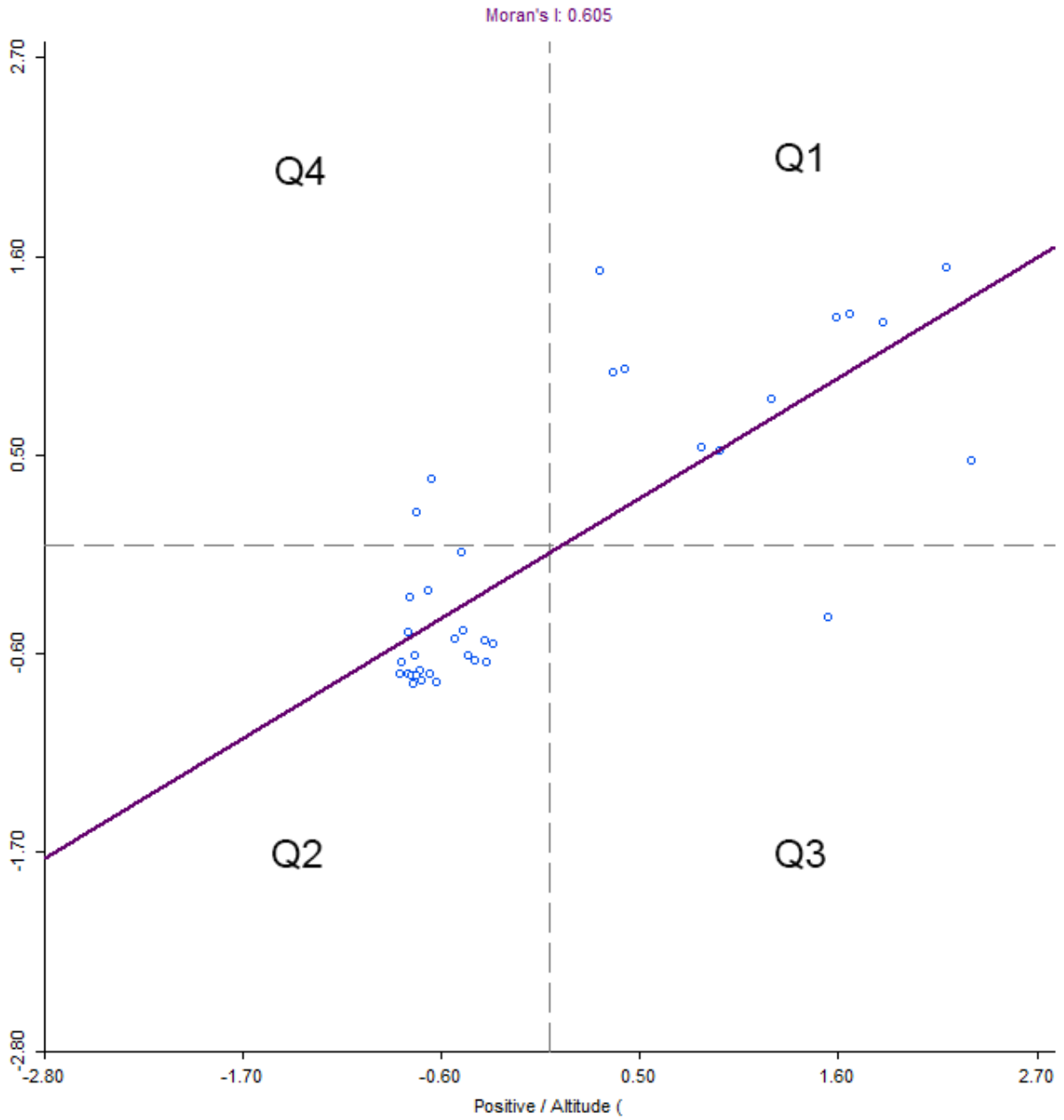


Figura 16 – Diagrama de espalhamento de Moran entre cães positivos e altitude indicando pontos de associação espacial positiva entre os quadrantes 1 e 2.

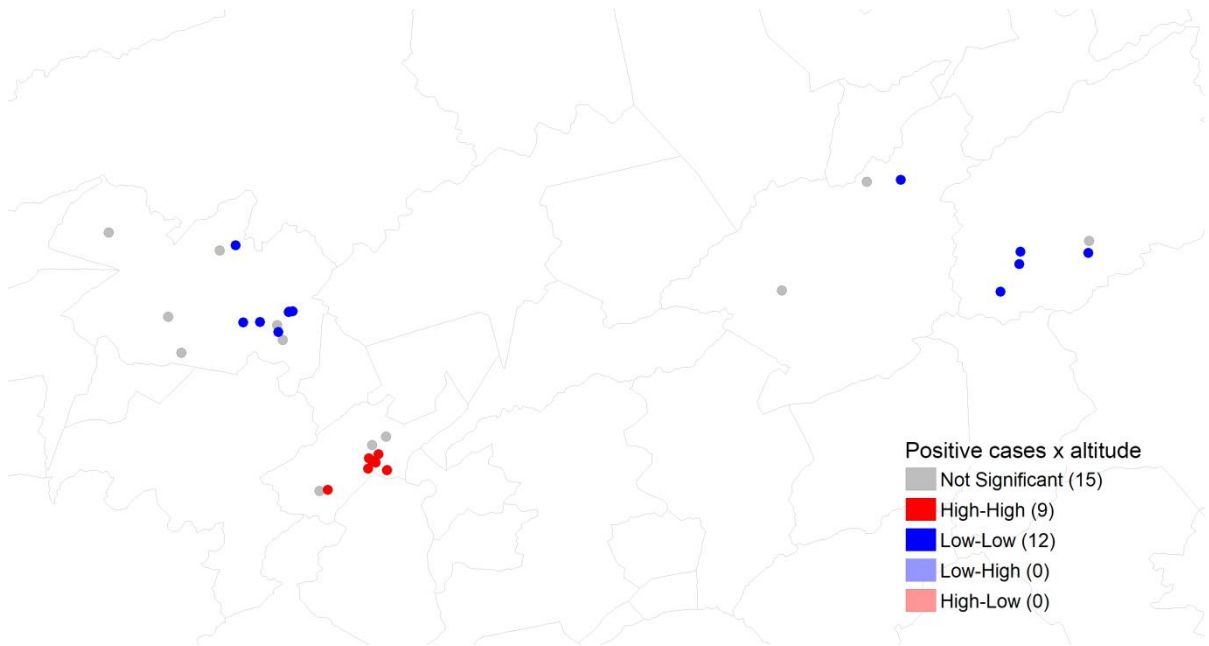


Figura 17 - Mapa de cluster de correlação espacial de casos positivos de *Babesia vogeli* x altitude. O gráfico é dividido em quatro quadrantes de acordo com os quatro cenários emergidos do agrupamento LISA. Os pontos vermelhos mostraram a alta correlação espacial com casos positivos e altitude e os pontos em azul mostraram a correlação mais baixa em ambas as variáveis. As outras cores não tiveram correlação espacial.

Na análise de regressão logística, a presença de carrapato foi uma das variáveis associada a positividade dos cães para *B. vogeli* (OR = 2,47) de um cão adquirir a infecção por *B. vogeli*. Quando aplicado a análise de autocorrelação espacial de casos positivos x presença de carrapato, este apresentou valor de LISA: -0,309 com valor de  $p=0,26$ , demonstrando baixa associação (Figura 18), porém quando a análise foi estabelecida entre presença de carrapato e a altitude, o mapa de agrupamento expôs existência de associação espacial entre carrapato e baixa altitude (valor I de Moran : 0,222 com valor de  $p=0,046$ ) (Figura 18).

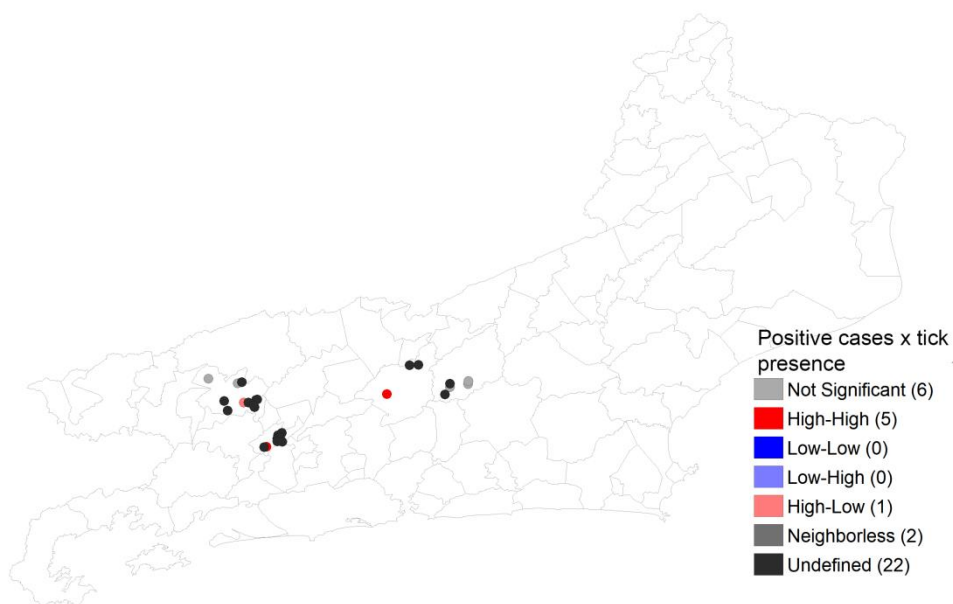


Figura 18 - Mapa de agrupamento de correlação espacial de casos positivos de *Babesia vogeli* e a presença de carrapato demonstrando baixa dependência espacial dos cães positivos com a variável presença de carrapatos. O gráfico é dividido em quatro quadrantes de acordo com os quatro cenários emergidos do agrupamento LISA. Os pontos vermelhos mostraram alta correlação espacial com casos positivos e presença de carrapatos e o ponto rosa mostrou alta correlação espacial nos casos positivos, mas menor com presença de carrapatos. As outras cores não tiveram correlação espacial.

Quanto a Figura 19 é necessário ressaltar que não são todos os animais positivos que apresentaram carrapato no momento de coleta, logo, os poucos (cinco) que apresentaram demonstraram associação espacial positiva em região de baixa altitude, com um ponto fora da curva em Petrópolis.

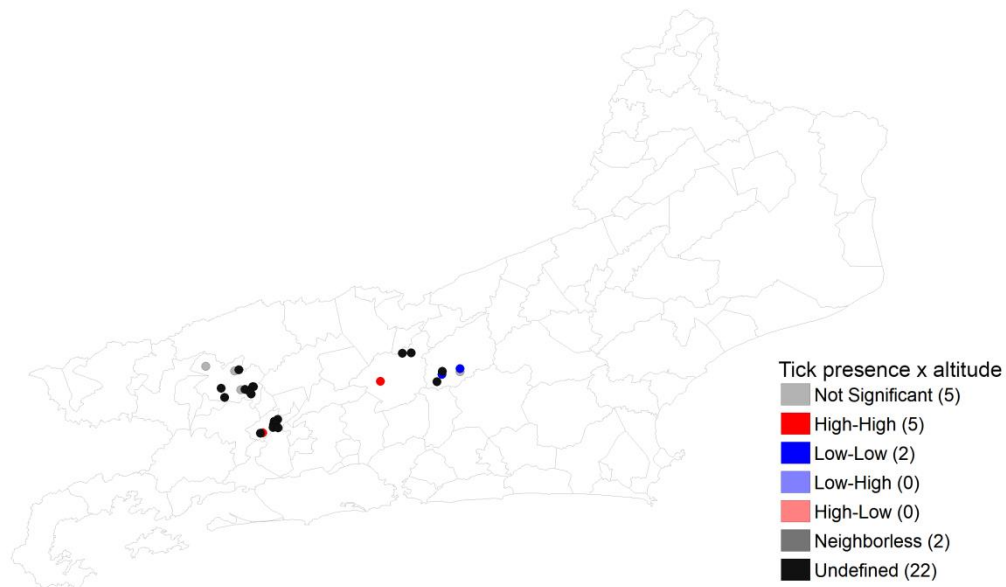


Figura 19 - Mapa de cluster de correlação espacial de cães infestados por carrapatos e a altitude. O gráfico é dividido em quatro quadrantes de acordo com os quatro cenários emergidos do agrupamento LISA. Os pontos vermelhos mostraram alta correlação espacial com presença de carrapatos e altitude e os pontos azuis mostraram baixa correlação em ambas as variáveis. As outras cores não tiveram correlação espacial.



## 5. DISCUSSÃO

Até o presente momento, não existem estudos publicados no Brasil que alinharam a metodologia epidemiológica, com diagnóstico molecular e análise filogenética à ferramenta SIG para hemoparasitos da ordem Piroplasmida. O uso do georreferenciamento aprimora a demonstração de resultados de estudos epidemiológicos, sejam eles de caráter zoonótico (BARBOSA *et al.*, 2014; BOUCHARD *et al.*, 2019) ou exclusivamente doenças transmitidas por carrapatos (DÍAZ *et al.*, 2018; MRLJAK *et al.*, 2017; SILVEIRA; PASSOS; RIBEIRO, 2009; TORINA *et al.*, 2018), pois permite a visualização da distribuição espacial dos agravos, contudo a seleção da ferramenta de análise espacial correta é primordial.

No presente estudo, a prevalência de *B. vogeli* encontrada (7,9%) foi superior à observada por outros autores na América do Sul que realizaram a detecção molecular do agente, como observado por Inácio *et al.* (2019) no Paraguai (5,5%). Esses autores realizaram a detecção molecular de *B. vogeli* e também de outros piroplasmas, como *Rangelia* sp. e *T. equi* em cães que foram atendidos em hospital veterinário, em uma região com altitude média de 43 m. Na presente tese a região com maior concentração de positivos observada através do mapa de Kernel (Figura 15), foi em Paracambi, que é um município com altitude média de 100m. Quanto as amostras de sangue coletadas foram de cães domiciliados, logo, ao contrário do trabalho de Inácio *et al.*, (2019), nenhum animal foi selecionado conforme a clínica ou acesso a exames laboratoriais ou até mesmo histórico. Quanto a altitude, a região com a maior intensidade do gradiente de cor inserido aponta para uma maior concentração em regiões de baixa altitude (< 600 m).

Mascarelli *et al.* (2015), na Argentina, também realizaram a detecção molecular de *B. vogeli* e outros hemoparasitos de importância médico veterinária. Das regiões de estudo, Córdoba (situado à média de 106 m de altitude) e Santa fé (média de 25 m de altitude) obtiveram prevalência de *B. vogeli* de 10% em Córdoba e 6,8% em Santa fé. É possível observar que no presente trabalho, a prevalência de 7,9% foi próxima a média apresentada por Mascarelli *et al.* (2015), porém a média da região da baixada fluminense (< 600m) foi de 10,85% merece destaque, e mostrou-se bem diferente da média da região serrana (> 600m) que foi de 4,35%.

No Chile, Di Cataldo *et al.*, (2020) também realizaram a detecção da sequência de 18S *rRNA* de *B. vogeli*, sendo a primeira descrição deste piroplasma na região, segundo os autores. A prevalência encontrada de 6,3% em 25 animais atendidos no hospital da cidade de Vicuña, na região de Coquimbo que tem altitude média de 547 m, os autores apontam a presença de *R. sanguineus* na maioria dos animais e corrobora com os achados abaixo de 600m realizados na presente tese.

Por outro lado, Vargas-Hernández *et al.* (2012) realizaram a detecção molecular e sorológica de *B. vogeli*, resultando em prevalência de 5,4% e 51,6%, respectivamente, em Bogotá, na Colômbia, cidade com altitude média de 2591m. Embora a altitude seja muito acima dos locais investigados neste estudo observa-se que a prevalência através de diagnóstico molecular está compatível com o resultado encontrado na região Serrana. Além disso, os autores também permitiram observar o quanto o teste sorológico pode identificar uma quantidade maior de cães positivos comparados à detecção molecular, pois a detecção alta de 51,6% é devida a soroconversão dos animais que tiveram contato com o agente previamente ao estudo, podendo em alguns casos serem classificados como falso-positivos devido a menor especificidade e possibilidade de reações cruzadas, conforme destacado por Vargas-Hernández *et al.* (2012).

No presente estudo, das variáveis com p-valor significativo à positividade encontrada, a altitude (<600m) foi a que mais se destacou. Tanto nos resultados apresentados pela distribuição de Kernel, quanto na autocorrelação espacial representada pelo Índice de Moran. No caso, assim como aqui apresentado, Gilbert (2010) e Tsatsaris *et al.* (2016) que

descreveram em seus estudos que as regiões de baixa altitude apresentam mais espécimes de carrapatos do que em regiões mais altas e, em um ambiente com mais carrapatos, os hospedeiros poderiam ser acometidos por agentes transmitidos por estes vetores. No trabalho de Gilbert (2010), o autor realizou o estudo na Escócia em uma região de 1300m de altitude, onde ocorria a espécie de carrapato *Ixodes ricinus*. No presente trabalho, a espécie de carrapato associada aos cães positivos para *B. vogeli* foi *R. sanguineus*, que em países tropicais, com elevada temperatura e umidade, apresenta ampla distribuição como nos países da América do Sul (LABRUNA *et al.*, 2017; ZEMTSOVA *et al.*, 2016).

Até o presente momento, nenhum outro trabalho na Medicina Veterinária utilizou a interpolação do Vizinho mais próximo – (NN) - *Nearest Neighbors Prediction Method* para hemoparasitoses, embora, o trabalho de Ward e Carpenter (2000) apontam as diversas possibilidades desta interpolação nos estudos epidemiológicos em Medicina veterinária, visto que o conhecimento sobre o comportamento dos dados espaciais permite estimar e aplicar as medidas preventivas com maior eficiência, o que corrobora com a aplicação desta técnica neste trabalho, que identificou os “clusters” e as zonas com menor agregação, favorecendo ampliar o conhecimento epidemiológico espacial a respeito de *B. vogeli*.

Quanto a análise de densidade de positivos aplicada pelo mapa de Kernel, Qviller *et al.*, (2016), desenvolveram uma análise espacial da distribuição de carrapatos, aplicando uma interpolação da distribuição pelo mapa de Kernel, sendo capaz de verificar a distribuição dos carrapatos a cada 20 m<sup>2</sup>. No presente trabalho, a categorização do mapa kernel permitiu a observação da concentração de nove a 12 casos na cidade de Paracambi, região de altitudes abaixo de 200m e, conforme a altitude aumentava a concentração de casos diminuía de forma considerável. Zhang *et al.* (2019) analisaram a distribuição das espécies de carrapatos apenas com mapas de pontos em regiões distantes entre si, apresentando dados agregados. As ferramentas geoespaciais permitem a ampliação do conhecimento sobre a dinâmica ecológica de carrapatos em diferentes ambientes como foi demonstrado por Tsatsaris *et al.* (2016).

Quanto à distribuição espacial analisada através da autocorrelação pelo índice de Moran local, esta metodologia não foi usada para análise de parasitos até a presente data. É importante ressaltar que o baixo número de positivos com presença de carrapato pode ter interferido no número alto de pontos indefinidos e que não apresentam relevância quando a dependência espacial, no entanto, a análise foi favorável para demonstrar a associação espacial entre cães positivos e a altitude, podendo assim demonstrar que é uma análise que ainda precisa de adaptações em número amostral baixo ou que apresentam distâncias grandes entre pontos de localização, como o que ocorreu neste trabalho. Destes, Yang *et al.* (2020) analisaram a distribuição e autocorrelação do tempo de ativação parcial da tromboplastina com a altitude, obtendo ao final, que há regiões do estudo com correlação positiva. No caso dos resultados da análise de LISA aqui realizada foi encontrada uma correlação positiva entre altitude e casos positivos enfatizando a associação discutida e mostrada aqui. Identificado também pelo mapa de Kernel, em que Paracambi, seguido de Barra do Pirai apresentam maior graduação da tonalidade indicando concentração de animais positivos na detecção de *18S rRNA* de *B. vogeli*, enfatizada pelos resultados de NN. As interpolações utilizadas na análise espacial deste trabalho foram complementares.

Em relação à associação estatística de positividade com a estação do ano, o período chuvoso mostrou-se mais associado aos casos positivos corroborando com Costa-Júnior (2009) que observou que no período seco houve diminuição da prevalência de *B. vogeli* em Minas Gerais. O clima mais quente (ZEMTSOVA *et al.*, 2016) e o período chuvoso em baixa altitude nas regiões proporcionam ambientes favoráveis para a proliferação do carrapato (GILBERT, 2010), pois tanto a umidade quanto a temperatura contribuem para a reprodução do carrapato, principalmente no que diz respeito à incubação de ovos no ambiente (SONENSHINE, 1993). Não obstante, visto o impacto abiótico que mudanças climáticas

podem representar em relação a proliferação de vetores artrópodes, torna-se necessário aprimorar as pesquisas sobre a influência das mudanças climáticas na epidemiologia das doenças transmitidas por carrapatos, pois já existem trabalhos como de Zemtsova *et al.*, (2016) e Bouchard *et al.*, (2019), que demonstram a influência climática na reprodução do ectoparasita, logo podendo ampliar a ocorrência das doenças que afetam os cães.

Outro fator que apresentou associação estatística com os casos positivos deste estudo e que já foi relatado por outros autores, é a falta de abrigos para os animais, que apesar do *R. sanguineus* apresentar hábito nidícola (LABRUNA; PEREIRA, 2001) a falta de local para repousar pode se relacionar a maior exposição às adversidades ambientais mais significativas, e a ausência de local fixo para descanso (SANTOS *et al.*, 2013). Essa associação também foi relatada por Mrljak *et al.* (2017) e Paulino *et al.* (2018).

As variáveis como zona (urbana e rural) não apresentou associação com a positividade em cães, o que foi demonstrado também por outros autores como Dantas-Torres *et al.*, 2006 e Paulino *et al.* (2018) e apesar de autores como Passos *et al.* (2005) indicarem a maior prevalência de casos em zona urbana devido a maior probabilidade de infestações por *R. sanguineus* é possível observar que este vetor encontra-se de forma ubíqua segundo estudos mais recentes, principalmente na América do Sul (MAGGI; KRÄMER, 2019), sendo dificilmente inserida como uma variável de maior importância atualmente. A temperatura é outro ponto importante, que como no estado do Rio de Janeiro há uma maior predominância de climas quentes e sendo o Brasil um país tropical a não ocorrência de associação deste fator é compatível com a realidade ambiental encontrada neste estudo, achado este também abordado por Labruna and Pereira (2001).

Apesar de alguns estudos demonstrarem uma associação do sexo do animal, raça e tamanho de pelagem associados à infecções por *Babesia* sp. (MOORE, 2002; VENEZIANO *et al.*, 2018) nenhuma destas variáveis foi observada como sendo algum fator que pudesse contribuir com os casos positivos encontrados neste estudo. A explicação indicada pelos autores está relacionada a cães machos, devido a fatores hormonais apresentarem maior risco e susceptibilidade. Quanto a raça e pelagem, que são duas variáveis relacionadas entre si, as raças com pelos mais compridos podem estar associadas a menor visualização do ectoparasita, no entanto, autores como Maia *et al.* (2007), Costa-Júnior *et al.* (2009) e Paulino *et al.*, (2018) não obtiveram nenhuma associação destas variáveis, corroborando com o presente trabalho.

Em relação aos fatores abióticos, que mostraram influenciar o comportamento dos carrapatos, a existência de uma grande quantidade de carrapatos pode potencializar a transmissão de patógenos. Este estudo apresentou associação estatística com a positividade de *B. vogeli* em áreas com maior número de carrapatos, o que corrobora com outros autores como Passos *et al.* (2005) e Paulino *et al.* (2018) que verificam que na presença do vetor há maior potencial de transmissão do agente. O trabalho de Paulino *et al.* (2018), encontrou também *Amblyomma* sp., além de *R. sanguineus* s.l, no entanto, apenas a espécie *R. sanguineus* s.l foi associada (OR = 3,32; p 0,003; IC: 1,57 - 7,01) à positividade de *B. vogeli*, indicando esta espécie de carrapato como o principal vetor (PASSOS *et al.*, 2005).

Na regressão logística, os fatores identificados como associados ao risco de transmissão de *B. vogeli* tiveram relação direta com a presença do vetor. Os cães da região de baixa altitude apresentaram 2,29 mais chances de adquirir infecção pelo agente bem como o período chuvoso, que aumenta em 2,45 vezes a chance de ocorrência da infecção em cães. Ambas as variáveis se relacionam diretamente com o favorecimento da ocorrência do vetor. Somado a isso, cães infectados por *R. sanguineus* s.l. apresentam 2,47 vezes mais chances de adquirir infecção por *B. vogeli*. Castro *et al.*, (2020) observaram também a associação de carrapatos com a positividade em cães para *B. vogeli* em Cuiabá.

É importante ressaltar que autores como Bilic *et al.*, 2018 e Maggi e Kramer, 2019 apontam para as possíveis mudanças tanto no perfil de distribuição geográfica das babesioses

e de seus vetores artrópodes que podem ser associadas a diversas questões, tal como fatores ecológicos, incluindo mudanças climáticas, maior mobilidade dos cães com seus tutores (viagens, passeios), mudanças no ambiente de cunho antropogênico e até fatores socioeconômicos, que neste caso as regiões de baixa altitude, principalmente Paracambi, que foi o município com maior positividade entre os municípios estudados, também é o município com menor Produto Interno Bruto (PIB) e menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) dentre os quatro municípios estudados (IBGE, 2018). Quanto aos municípios de alta altitude, Petrópolis, que apresentou o menor número de casos, apresenta PIB e IDH muito superior aos dos outros municípios estudados, podendo ser associada ao menor número de casos, em vista de melhores condições financeiras do tutor na realização de métodos preventivos e tratamentos.

Em relação à variabilidade genética, na análise de entropia, a região V4 apresentou maior heterogeneidade entre as sequências de *18S rRNA* de *B. vogeli*. Este segmento é correspondente à região que contém maior hipervariabilidade em eucariotos, sendo também a melhor região para análise de biodiversidade (HADZIAVDIC *et al.*, 2014; NICKRENT; SARGENT, 1991). O trabalho de Bhoora *et al.*, (2009) abordou a variabilidade da região de hipervariabilidade V4 de *T. equi* e encontrou uma identidade variando de 96,1 a 99,9%, enquanto que neste estudo, as sequências de *B. vogeli* apresentaram percentual de variação com variação de 99,9 a 100%, mostrando menor heterogeneidade. Embora as sequências neste estudo fossem de áreas diferentes, com gradientes de altitudes variáveis, estas não apresentaram variação filogeográfica e essa homogeneidade em *B. vogeli* é observada também quando comparada a sequências de outras partes do mundo, relatado em outros estudos. Barbosa *et al.* (2020) também compararam as sequências produzida por eles com outras depositadas no Genbank e observaram a mesma variação baixa, assim como Castro *et al.* (2020). Quanto a análise da região V4 em específico, por meio dessa análise molecular da sequência *18S rRNA* de *B. vogeli* foi possível observar um baixo índice de divergência genética ao longo de anos, podendo considerá-la uma espécie com estabilidade gênica, no geral.

Além disso, apesar das sequências deste estudo identificar somente a espécie *B. vogeli*, três das 36 sequências obtidas apresentaram baixa qualidade de leitura, com muitos aminoácidos degenerados, sendo necessária a melhoria destas amostras e/ou talvez a utilização de outros iniciadores ou até mesmo outras técnicas moleculares para identificar estas sequências inconsistentes. Não obstante, apesar das sequências não apresentaram qualidade nas leituras, as mesmas amplificaram, devido a existência de complementariedade com o primer utilizado, o mesmo por Inácio *et al.* (2019). e é importante ressaltar que trabalhos como de Lemos *et al.*, 2012 e Soares *et al.*, 2018 indicarem a existência de *R. vitalli* no Brasil, inclusive Lemos *et al.*, 2012 encontraram a espécie circulando no estado Rio de Janeiro.

Embora *B. vogeli* não represente risco a seres humanos, por não ser uma espécie zoonótica (HILDEBRANDT; GRAY; HUNFELD, 2013) a ocorrência de babesiose pode trazer prejuízos a saúde de cães, principalmente animais jovens (ROTONDANO *et al.*, 2015) e/ou com algum tipo de disfunção imunológica (MATIJATKO *et al.*, 2009). Além disso, em relação ao seu vetor competente, a espécie *R. sanguineus* pode representar risco a saúde de humanos devido ao seu potencial de transmissão de *Rickettsia rickettsii* (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2013). Este é um fator de grande importância, com impacto na saúde pública, pois já existem relatos a respeito de *R. rickettsii* em Barra do Piraí (baixada) e Petrópolis (serrana), municípios que foram trabalhados no presente estudo (MONTENEGRO *et al.*, 2017). Além disso, apesar de não ser o objetivo deste trabalho, foi possível observar que 40,7% dos animais estavam infestados pelo carrapato da espécie *Amblyomma sculptum*, podendo ser útil em estudos futuros.

Adicionalmente, o uso de ferramentas de análise espacial em estudos de doenças por carrapatos, como *B. vogeli*, poderia ampliar os programas preventivos com maior engajamento da dinâmica de doenças com o vetor e o meio ambiente.

## 6. CONCLUSÃO

Dos piroplasmas caninos no estado do Rio de Janeiro nos municípios estudados de Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis apresentam prevalência da espécie *B. vogeli*, que está relacionada à presença de *R. sanguineus* s.l. e aos fatores ambientais estudados, como estação chuvosa e região de baixa altitude (abaixo de 600m) proporcionando condições favoráveis para a proliferação e manutenção do vetor e, conseqüentemente, favorecendo as infecções por *B. vogeli* em cães domiciliados nessas regiões.

As técnicas de análise espacial favorecem a observação dos casos positivos e podem ser uma ferramenta útil para a epidemiologia e prevenção de *B. vogeli*, no entanto, mais estudos devem ser feitos para aprimorar o uso das análises à Medicina Veterinária.

Este estudo determinou que a região mais variável na sequência do *18SrRNA* de *B. vogeli* é a região V4. Embora esta região seja útil para estudos de variabilidade genética, não é o suficiente para analisar as variações filogeográficas de *B. vogeli* em cães, sendo fundamental a contínua busca por marcadores moleculares úteis para esta finalidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMU, Mathew *et al.* Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 119, 2014. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-119>>.

ADEMIR WEBER, André; ARTHUR WOLLMANN, Cássio. Mapeamento dos incêndios residências na área urbana de Santa Maria, RS, Brasil utilizando o estimador de densidade Kernel. *Investigaciones Geográficas*, n. 51, p. 49, 30 jul. 2016. Disponível em: <<https://investigacionesgeograficas.uchile.cl/index.php/IG/article/view/41748>>.

ANSELIN, Luc. Local indicators of spatial organization -LISA. *Geographical Analysis*, 1995.

ARAGÃO, Henrique; FONSECA, Flávio Da. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 59, n. 2, p. 115–129, jul. 1961. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761961000200001&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761961000200001&lng=pt&tlng=pt)>.

ARAUJO, Andreina C. *et al.* Babesia canis vogeli infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 456–461, maio 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2015000500456&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015000500456&lng=en&tlng=en)>.

ARZUA, Márcia *et al.* Amblyomma aureolatum and Ixodes auritulus (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Experimental and Applied Acarology*, v. 31, n. 3/4, p. 283–296, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:APPA.0000010381.24903.1c>>.

BANETH, Gad *et al.* Reclassification of Theileria annae as Babesia vulpes sp. nov. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 207, 8 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/207>>.

BANETH, Gad *et al.* Vector-Borne Diseases - constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasites & Vectors*, v. 5, n. 1, p. 55, 2012. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-55>>.

BARASH, Nanelle R. *et al.* Prevalence of Babesia spp. and clinical characteristics of Babesia vulpes infections in North American dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 33, n. 5, p. 2075–2081, 23 set. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvim.15560>>.

BARBOSA, Camila Oliveira Silva *et al.* Babesiosis caused by Babesia vogeli in dogs from Uberlândia State of Minas Gerais, Brazil. *Parasitology Research*, v. 119, n. 3, p. 1173–1176, 5 mar. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-019-06515-3>>.

BARBOSA, David Soeiro *et al.* Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta Tropica*, v. 131, p. 56–62, mar. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X13003513>>.

BARROS, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, Gervasio Henrique. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical : um guia ilustrado para identificação de espécies.*

[S.l.]: Butantã, 2006.

BECK, Louisa. Remote Sensing and Human Health: New Sensors and New Opportunities. *Emerging Infectious Diseases*, v. 6, n. 3, p. 217–227, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol6no3/beck.htm>>.

BECK, Relja *et al.* Diversity of Babesia and Theileria species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 7, p. 843–848, jun. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751909000277>>.

BECKER, Simone *et al.* Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, Latreille (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 10, n. 5, p. 1046–1050, ago. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X19300329>>.

BENITEZ, Aline do Nascimento *et al.* Spatial and simultaneous seroepidemiology of anti-Leishmania spp. antibodies in dog owners and their dogs from randomly selected households in a major city of southern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 2018.

BEUGNET, F.; MOREAU, Y. Babesiosis. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, v. 34, n. 2, p. 627–639, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://doc.oie.int/dyn/portal/index.seam?page=alo&aloId=33006>>.

BEUGNET, Frederic; LEBON, Wilfried; DE VOS, Christa. Prevention of the transmission of Babesia rossi by Haemaphysalis elliptica in dogs treated with Nexgard®. *Parasite*, v. 26, p. 49, 21 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2019051>>.

BHOORA, Raksha *et al.* Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within Theileria equi and Babesia caballi from horses in South Africa. *Veterinary Parasitology*, v. 159, n. 2, p. 112–120, fev. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708005396>>.

BICALHO, Kelly Alves; RIBEIRO, Múcio F. Barbosa; MARTINS-FILHO, Olindo Assis. Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotozoan Babesia canis infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 125, n. 3–4, p. 221–235, nov. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401704003851>>.

BIRKENHEUER, AJ *et al.* Babesia gibsoni infections in dogs from North Carolina. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 35, n. 2, p. 125–128, 1 mar. 1999. Disponível em: <<https://meridian.allenpress.com/jaaha/article/35/2/125/175525/Babesia-gibsoni-infections-in-dogs-from-North>>.

BISHOP, R. *et al.* Theileria : intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S271–S283, 19 out. 2004. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182003004748/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182003004748/type/journal_article)>.

BOOZER, A.Lindsay; MACINTIRE, Douglass K. Canine babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 33, n. 4, p. 885–904, jul. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561603000391>>.



BOUCHARD, C *et al.* Increased risk of tick-borne diseases with climate and environmental changes. *Canada Communicable Disease Report*, v. 45, n. 4, p. 83–89, 4 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/documents/services/reports-publications/canada-communicable-disease-report-ccdr/monthly-issue/2019-45/issue-4-april-4-2019/ccdrv45i04a02-eng.pdf>>.

BOUCHARD, Catherine *et al.* Integrated Social-Behavioral and Ecological Risk Maps to Prioritize Local Public Health Responses to Lyme Disease. *Environmental Health Perspectives*, v. 126, n. 4, p. 047008, 5 abr. 2018. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/EHP1943>>.

BOURDOISEAU, Gilles. Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1–2, p. 118–125, maio 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401706000628>>.

BRACCINI, G.L., CHAPLIN, E.L., STOBBE, N.S., Et al. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the veterinary faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 1986 – 1990. *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, v. 20, p. 134–149, 1992.

BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* Babesiosis in the Greyhound. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 182, n. 9, p. 978–982, 1983.

CABEZAS-CRUZ, Alejandro *et al.* Low genetic diversity of Ehrlichia canis associated with high co-infection rates in Rhipicephalus sanguineus (s.l.). *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 1, p. 12, 7 dez. 2019. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3194-9>>.

CAIRUS, Henrique F.; RIBEIRO JR., Wilson A. *Textos hipocráticos: o doente, o médico e a doença*. [S.l.]: Editora FIOCRUZ, 2005. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/9n2wg>>.

CAMACHO, A. T. *et al.* Infection of dogs in north-west Spain with a Babesia microti-like agent. *Veterinary Record*, v. 149, n. 18, p. 552–555, 3 nov. 2001. Disponível em: <<https://veterinaryrecord.bmj.com/lookup/doi/10.1136/vr.149.18.552>>.

CAMARA, G., MEDEIROS, J.S. Princípios básicos em geoprocessamento. *Sistema de Informações Geográficas - Aplicações na Agricultura*. 2. ed. Brasília: Embrapa, 1998. p. 434.

CARINI, A.; MACIEL, J. Sobre a moléstia dos cães, chamada nambiuvú, e o seu parasita (Rangelia vitalli). *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, v. 3, p. 65–71, 1914.

CARLI, E. *et al.* Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with Babesia canis canis or Babesia canis vogeli infection. *Veterinary Parasitology*, v. 162, n. 1–2, p. 51–57, maio 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709001022>>.

CARRET, CÉLINE *et al.* Babesia Canis Canis, Babesia Canis Vogeli, Babesia Canis Rossi: Differentiation of the Three Subspecies By A Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis On Amplified Small Subunit Ribosomal Rna Genes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 298–301, maio 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128.x>>.

CASSINI, R. *et al.* Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and

invertebrate hosts. *Veterinary Parasitology*, 2009.

CASTRO, Vanessa Vieira *et al.* Molecular prevalence and factors associated with *Babesia vogeli* infection in dogs in the Cerrado Mato-Grossense region of Brazil. *Ciência Rural*, v. 50, n. 2, 2020. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782020000200500&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782020000200500&tlng=en)>.

CHAUVIN, Alain *et al.* *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, p. 37, 21 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.vetres.org/10.1051/vetres/2009020>>.

CHISU, Valentina *et al.* Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Babesia* and *Theileria* spp. in ticks from domestic and wild hosts in Sardinia. *Acta Tropica*, v. 196, p. 60–65, ago. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X19304668>>.

COHN, L.A., BIRKENHEUER, A.J. Cytauxzoonosis. In: Sykes L, Greene C, editors. *Infectious diseases of the dog and cat*. St Louis: Elsevier Saunders. [S.l: s.n.], 2012. p. 764–771.

COLLETT, M.G. Survey of canine babesiosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 71, n. 3, 10 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.jsava.co.za/index.php/jsava/article/view/710>>.

COSTA-JÚNIOR, L.M. *et al.* Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Research in Veterinary Science*, v. 86, n. 2, p. 257–260, abr. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528808001550>>.

COSTA-JUNIOR, Livio Martins *et al.* Occurrence of ectoparasites on dogs in rural regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 237–242, set. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612012000300011&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612012000300011&lng=en&tlng=en)>.

CRIADO-FORNELIO, A. *et al.* Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and Hepatozoon in southern Europe. *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 3–4, p. 189–201, maio 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401703000785>>.

CRIADO, A. *et al.* New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*, v. 142, n. 3–4, p. 238–247, dez. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440170600402X>>.

D.C. PLUMB. *Plumb's Veterinary Drug Handbook Wiley-Blackwell*. 8th editio ed. [S.l.]: AMES, 2015.

DA SILVA, Aleksandro S. *et al.* Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Experimental Parasitology*, v. 128, n. 4, p. 347–352, ago. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489411001494>>.

DANTAS-TORRES, Filipe. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus*

sanguineus. *Parasites & Vectors*, v. 3, n. 1, p. 26, 2010. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-26>>.

DANTAS-TORRES, Filipe *et al.* Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. *Parasites & Vectors*, v. 13, n. 1, p. 195, 21 dez. 2020. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04056-8>>.

DANTAS-TORRES, Filipe. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 3–4, p. 173–185, abr. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401707006838>>.

DANTAS-TORRES, Filipe; OTRANTO, Domenico. Erratum to: Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 298, 23 dez. 2016. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1571-9>>.

DE SOUSA, Keyla Carstens Marques *et al.* Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 2, p. 245–253, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X17301620>>.

DE WALL, D.T. Equine piroplasmosis: A review. *British Veterinary Journal*, v. 148, n. 1, p. 7–14, 1992.

DEAR, Jonathan D. *et al.* Babesia conradae infection in coyote hunting dogs infected with multiple blood-borne pathogens. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 32, n. 5, p. 1609–1617, set. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvim.15233>>.

DI CATALDO, Sophia *et al.* Babesia vogeli in dogs in Chile. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 67, n. 6, p. 2296–2299, 17 nov. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.13609>>.

DÍAZ, Fabián E. *et al.* Geographical distribution and phylogenetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato in northern and central Chile. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 4, p. 792–797, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X17304922>>.

DUARTE, Sabrina Castilho *et al.* Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 1–2, p. 16–20, mar. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401707006693>>.

EIRAS, Diego Fernando *et al.* First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. *Parasitology International*, v. 63, n. 5, p. 729–734, out. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576914000774>>.

ESRI (ENVIRONMENTAL SYSTEMS RESOURCE INSTITUTE). *ArcGIS Desktop: Release 10.4. Redlands CA*. [S.l.: s.n.], 2016

ESTRADA-PEÑA, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, v. 34, n. 1, p. 53–65, 1 abr. 2015. Disponível em:

<<https://doc.oie.int/dyn/portal/index.seam?page=alo&aloId=32321>>.

ESTRADA-PEÑA, A. *et al.* *Ticks of domestic animals in the Mediterranean region*. [S.l: s.n.], 2004.

ESTRADA-PEÑA, Agustín *et al.* *Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens- methodological principles and caveats*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. [S.l: s.n.], 2013

EVANS, DE; MARTINS, JR; GUGLIELMONE, AA. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 4, p. 453–470, ago. 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762000000400003&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762000000400003&lng=en&tlng=en)>.

FARWELL, G. E.; LEGRAND, E. K.; COBB, C. C. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, n. 5, p. 507–11, 1 mar. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7061333>>.

FÖLDVÁRI, Gábor *et al.* *Dermacentor reticulatus: A vector on the rise*. *Parasites and Vectors*. [S.l: s.n.], 2016

FRANÇA, Raqueli T. *et al.* Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day – A review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 5, p. 466–474, set. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X1400082X>>.

FRITZ, Denis. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, v. 106, n. 6, p. 1339–1342, 10 maio 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-1804-3>>.

FUKATA, Tsuneo *et al.* Detection of Canine Erythrocytes Infected with *Babesia gibsoni* by Flow Cytometry. *The Journal of Parasitology*, v. 82, n. 4, p. 641, ago. 1996. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3283793?origin=crossref>>.

FURLANELLO, T. *et al.* Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, v. 134, n. 1–2, p. 77–85, nov. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401705003699>>.

FYFE, Corey *et al.* Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016.

GAFFAR, F. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites\*1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 136, n. 1, p. 25–34, jul. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016668510400057X>>.

GARCÍA-BOCANEGRA, Ignacio *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *The Veterinary Journal*, v. 195, n. 2, p. 172–178, fev. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023312002444>>.

- GORDIS, L. *Epidemiology*. 1° ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996.
- GUGLIELMONE, A.A. *et al.* Hosts and distribution of *Amblyomma auricularium* and *Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v. 29, n. 1/2, p. 131–139, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1024251020035>>.
- HADZIAVDIC, Kenan *et al.* Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e87624, 7 fev. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0087624>>.
- HALL, T.A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HENNING, M. W. *Animal diseases in South Africa*. 2. ed. South Africa: Central News Agency, 1949.
- HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. S.; HUNFELD, K.-P. Human Babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*, v. 41, n. 6, p. 1057–1072, 9 dez. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s15010-013-0526-8>>.
- HOMER, Mary J. *et al.* Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 3, p. 451–469, 1 jul. 2000. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>>.
- IBGE. *Censo 2010. Atlas censo demografico*. [S.l: s.n.], 2013.
- INÁCIO, Esmeralda Leonor *et al.* Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 10, n. 2, p. 321–327, fev. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X18301997>>.
- IRWIN, Peter J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, v. 2, n. Suppl 1, p. S4, 2009. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>>.
- JACOBSON, Linda S. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994–2004. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1–2, p. 126–139, maio 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440170600063X>>.
- JALOVECKA, Marie *et al.* The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, 23 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00248/full>>.
- JESSEN, Hans Christian; MENARD, S. Applied Logistic Regression Analysis. *The Statistician*, v. 45, n. 4, p. 534, 1996. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/10.2307/2988559?origin=crossref>>.
- JONGEJAN, Frans *et al.* “Tekenscanner”: a novel smartphone application for companion animal owners and veterinarians to engage in tick and tick-borne pathogen surveillance in the Netherlands. *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 1, p. 116, 26 dez. 2019. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3373-3>>.
- KAKOMA, Bulaimu; MEHLHORN, Heinz. Babesia of Domestic Animals. *Parasitic Protozoa*. [S.l.]: Elsevier, 1994. p. 141–216. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124260177500086>>.

KELLER, Ninette *et al.* Prevalence and Risk Factors of Hypoglycemia in Virulent Canine Babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 18, n. 3, p. 265, 2004. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1892/0891-6640\(2004\)18%3C265:PARFOH%3E2.0.CO;2](http://doi.wiley.com/10.1892/0891-6640(2004)18%3C265:PARFOH%3E2.0.CO;2)>.

KELLY, Patrick; KOSTER, Liza; LOBETTI, Remo. Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, v. 10, n. 6, p. 119, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/canine-babesiosis-a-perspective-on-clinical-complications-biomarkers-a-peer-reviewed-article-VMRR>>.

KERBER, Claudia E. *et al.* Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 04, p. 1–8, 2009. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbpv.01804001>>.

KJEMTRUP, Anne M. *et al.* *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine Babesia identified in California. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1–2, p. 103–111, maio 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401706000604>>.

KLEDMANEE, Kan *et al.* Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of ehrlichia canis, babesia spp and hepatozoon canis in canine blood. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 40, p. 35–39, 2009.

KOCH, H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Annals of Entomological Society of America*, v. 75, n. 5, p. 583–586, 1982.

KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>>.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clinica Veterinária*, v. 30, n. 1, p. 24–32, 2001. Disponível em: <<http://r1.ufrj.br/adivaldofonseca/wp-content/uploads/2014/06/Labruna-et-al-2001-carrapatos-caes-CLIN-VET.pdf>>.

LABRUNA, Marcelo B. *et al.* Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 36, n. 1–2, p. 149–163, maio 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10493-005-2563-1>>.

LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice-Nutrition*, v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.

LAVERAN, A. Contribution a l'étude du Piroplasma equi. *Recall Medicine Veterinary*, v. 8, p. 380, 1901.

LEE, Mi-Jin *et al.* Epidemiologic and Clinical Surveys in Dogs Infected with Babesia gibsoni in South Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 9, n. 6, p. 681–686, dez. 2009. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2008.0116>>.

LEMO, Tatiana Didonet *et al.* Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 137–142, jun. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612012000200012&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612012000200012&lng=en&tlng=en)>.

LEVINE, N. D. *Protozoan parasites of domestic animals and man*. 2. ed. Minnesota: Burgess Publishing, 1973.

LITTLE, Susan E.; HOSTETLER, Joe; KOCAN, Katherine M. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Veterinary Parasitology*, v. 150, n. 1–2, p. 139–145, nov. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401707004347>>.

LONGLEY, P.A.; FRANK GOODCHILD, Michael. Geographic Information Science and Systems. *International Encyclopedia of Human Geography*. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 29–36. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081022955105578>>.

LORETTI, A.P.; BARROS, S.S. Parasitismo Por Rangelia Vitalli Em Cães (" Nambiuú ", " Peste De Sangue)- Uma Revisão Crítica Sobre O Assunto. *Arq.Inst.Biol*, 2004.

LORETTI, Alexandre Paulino; BARROS, Severo Sales. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 134, n. 3–4, p. 193–213, dez. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401705003626>>.

MACIEIRA, Daniel de Barros *et al.* Prevalence of Ehrlichia canis infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 1, p. 44–48, mar. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00008.x>>.

MACINTIRE, Douglass K. *et al.* Babesia gibsoni infection among dogs in the southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 220, n. 3, p. 325–329, fev. 2002. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2002.220.325>>.

MAGGI, Ricardo G.; KRÄMER, Friederike. *A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. Parasites and Vectors*. [S.l.: s.n.], 2019

MAIA, Monica G. *et al.* Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 79, n. 2–4, p. 155–162, maio 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587706002546>>.

MALEKIFARD, Farnaz *et al.* Detection of Theileria equi and Babesia caballi using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, v. 5, p. 129–133, 2014.

MARTINS, João R. *et al.* First record of Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) parasitizing Alouatta guariba (Humboldt) (Primata: Atelidae) in southern Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 15, p. 203–205, 2006.

MARTINS, Thiago F. *et al.* Nymphs of the genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 1, n. 2, p. 75–99, jun. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X10000348>>.

MASI PALLARES, R.; BENITEZ USHER, C. A. DE LA DISTRIBUCION DE IXODINA (VAN DER HAMMEN, 1968) EN EL PARAGUAY. *Revista Paraguaya de Microbiología*, v. 17, p. 49–52, 1982.

MATIJATKO, Vesna *et al.* Septic shock in canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 2009.

MATJILA, P.T. *et al.* Detection of a Theileria species in dogs in South Africa. *Veterinary Parasitology*, v. 157, n. 1–2, p. 34–40, out. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708003439>>.

MEHLHORN H, SCHEIN E, Ahmed JS. Theileria. *Kreier JP Parasitic protozoa*. New York: Academic, 1993. p. 217–304.

MEHLHORN, Heinz; SCHEIN, Eberhard. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. *Advances in Parasitology*. [S.l.: s.n.], 1985. p. 37–103. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08602857>>.

MENEZES, P.M.L.; FERNANDES, M.C. *Roteiro de cartografia*. . [S.l.]: Oficina de Textos. , 2013

MIERZEJEWSKA, Ewa J. *et al.* Mapping of Dermacentor reticulatus expansion in Poland in 2012–2014. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 1, p. 94–106, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X15300091>>.

MINERVINO, Antonio Humberto Hamad *et al.* Factors associated with the prevalence of antibodies against Theileria equi in equids of Western Pará, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 67, n. S2, p. 100–105, 8 jul. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.13268>>.

MIRÓ, Guadalupe *et al.* Theileria annae (syn. Babesia microti-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 217, 10 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/217>>.

MOORE, Sarah L. Parasites as a Viability Cost of Sexual Selection in Natural Populations of Mammals. *Science*, v. 297, n. 5589, p. 2015–2018, 20 set. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1074196>>.

MOREIRA, João Pedro Gonçalves. Sobre a natureza do nambiuvú dos cães. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v. 9, p. 315–319, 1938.

MORETTI, Annabella *et al.* Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: A preliminary study. *The Veterinary Journal*, v. 184, n. 3, p. 346–350, jun. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023309001257>>.

MRLJAK, Vladimir *et al.* Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 17, n. 6, p. 398–408, jun. 2017. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2016.1990>>.

NARDI, Susilene Maria Tonelli *et al.* Geoprocessamento em Saúde Pública: fundamentos e aplicações. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 72, n. 3, p. 185–191, 2013. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/22284/23728>>.



NAVA, S. *et al.* The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Paraguay. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 101, n. 3, p. 255–270, 18 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/136485907X176319>>.

NICKRENT, Daniel L.; SARGENT, Malcolm L. An overview of the secondary structure of the V4 region of eukaryotic small-subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 2, p. 227–235, 1991. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/19.2.227>>.

NUTALL GHF; STRICKLAND C. Die parasiten der pferdepiroplasmose resp. der “biliary fever”. *Zentralbl Bakt Mikrobiol*, v. 1, p. 524–525, 1912.

O'DWYER, L. H. *et al.* Babesia spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 02, p. 23–26, 2009. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbpv.01802005>>.

OGRZEWALSKA, Maria; UEZU, Alexandre; LABRUNA, Marcelo B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitology Research*, v. 108, n. 3, p. 665–670, 16 mar. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-2111-8>>.

OLIVEIRA, Ulisses Costa; DE OLIVEIRA, Petrônio Silva. Mapas de Kernel como Subsídio à Gestão Ambiental: Análise dos Focos de Calor na Bacia Hidrográfica do Rio Acaraú, Ceará, nos Anos 2010 a 2015. *Espaço Aberto*, 2017.

OTRANTO, Domenico *et al.* Ticks infesting humans in Italy and associated pathogens. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 328, 2014. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-328>>.

PARAENSE, W. Lobato; VIANNA, Yderzio Luiz. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 46, n. 3, p. 595–603, set. 1948. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761948000300005&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761948000300005&lng=pt&tlng=pt)>.

PASSOS, Lygia Maria Friche *et al.* First molecular detection of Babesia vogeli in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 81–85, jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401704004145>>.

PAULINO, Patrícia G. *et al.* Molecular epidemiology of Babesia vogeli in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 13, p. 160–165, ago. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405939018300558>>.

PECKLE, Maristela *et al.* Molecular characterization of Theileria equi in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 2, p. 349–353, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X17301930>>.

PECKLE, Maristela *et al.* Molecular epidemiology of Theileria equi in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Research*, v. 112, n. 5, p. 2017–2025, 9 maio 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-013-3360-0>>.

PESTANA, B.R. O Nambyuvú. *Rev. Méd.*, v. 22, p. 423–426, 1910.

PIRES, M.S. *Aspectos epidemiológicos de Rickettsia sp. e Babesia caballi em equinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do Estado do Rio de Janeiro*. 2013. 126 f. UFRRJ, 2013.

POSADA, David; CRANDALL, Keith A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v. 14, n. 9, p. 817–818, 1 out. 1998. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/14.9.817>>.

QUINLAN, James F.; SCARONE, Carlos A.; LANERI, José Luis. Cattle tick identification and seasonal variation in infestation rates in Paraguay. *Tropical Animal Health and Production*, v. 12, n. 4, p. 259–264, dez. 1980. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02236626>>.

RAGHAVAN, M.; MARTENS, P. J.; BURCHILL, C. Exploring the relationship between socioeconomic status and dog-bite injuries through spatial analysis. *Rural and Remote Health*, 2014.

RAR, Vera A. *et al.* Tickborne Pathogen Detection, Western Siberia, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 11, p. 1708–1715, nov. 2005. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/11/04-1195\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/11/04-1195_article.htm)>.

RENÉ-MARTELLET, Magalie *et al.* Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 223, 25 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/223>>.

RODRIGUES, Daniel Sobreira *et al.* Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6, p. 853–856, set. 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762002000600018&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000600018&lng=en&tlng=en)>.

RONCALLI AMICI, Raffaele. The history of Italian parasitology. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 1–3, p. 3–30, jul. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401701004204>>.

ROTHSCHILD, Chantal M. Equine Piroplasmiasis. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, n. 7, p. 497–508, jul. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080613003079>>.

ROTONDANO, Tereza Emmanuelle de Farias *et al.* Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and Hepatozoon spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, n. 1, p. 52–58, mar. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612015000100007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612015000100007&lng=en&tlng=en)>.

RUIZ DE GOPEGUI, Rafael *et al.* Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *The Veterinary Journal*, v. 174, n. 1, p. 129–132, jul. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023306001183>>.

SAKUMA, M.; SETOGUCHI, A.; ENDO, Y. Possible emergence of drug-resistant variants of *Babesia gibsoni* in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2009.

SALIM, Bashir *et al.* Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. *Acta Tropica*, v. 193, p. 78–83, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18316620>>.

SANTOS, Camila Santana Dos; NOUR, Alfredo Dib Abdul. Aplicação de Técnicas de Geoprocessamento para subsidiar a Análise e Tomada de Decisão no Âmbito da Atenção Básica para a Vigilância em Saúde. *Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales - ISSN 1988-7833*, 2017.

SANTOS, Pablo Grahl Dos *et al.* Classificação de terras segundo sua capacidade de uso e identificação de conflito de uso do solo em microbacia hidrográfica. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 11, n. 2, p. 146–157, 2012.

SANTOS, Huarrisson A. *et al.* Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 348, 11 dez. 2013. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-348>>.

SCHETTERS, TH. P. M. *et al.* Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology*, v. 115, n. 5, p. 485–493, 1 nov. 1997. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182097001686/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182097001686/type/journal_article)>.

SCHNITTGER, Leonhard *et al.* Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 8, p. 1788–1809, dez. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134812002365>>.

SCHORDERET-WEBER, Sandra *et al.* Blocking transmission of vector-borne diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 7, n. 1, p. 90–109, abr. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320716301191>>.

SCOLES, Glen A.; UETI, Massaro W. Vector Ecology of Equine Piroplasmiasis. *Annual Review of Entomology*, v. 60, n. 1, p. 561–580, 7 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-010814-021110>>.

SILVA, Bruna Regina Figura Da *et al.* *Rangelia vitalii* infection in a dog from São Paulo city, Brazil: case report. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 56, n. 3, p. e150791, 29 out. 2019. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/150791>>.

SILVEIRA, Júlia A.G.; PASSOS, Lygia M.F.; RIBEIRO, Múcio F.B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 161, n. 3–4, p. 270–275, maio 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709000806>>.

SIMÕES, Paula *et al.* Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, p. 50, 2011. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-50>>.

SNOW, J. *On the mode of communication of cholera. Snow on cholera*. second ed. New York: [s.n.], 1965.

SOARES, João F. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 180, n. 3–4, p. 203–208, ago. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711001932>>.

SOARES, João F. *et al.* Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelioidosis. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 5, p. 1221–1234, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X18301134>>.

SOARES, João F. *et al.* Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 202, n. 3–4, p. 156–163, maio 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401714001575>>.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*, v. 157, n. 3–4, p. 211–221, nov. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440170800366X>>.

SOLANO-GALLEGO, Laia *et al.* A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 336, 11 dez. 2016. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1596-0>>.

SOLANO-GALLEGO, Laia; BANETH, Gad. Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n. 1, p. 48–60, set. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711002846>>.

STEINMAN, Amir *et al.* Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology*, 2012.

SUMBRIA, Deepak *et al.* Equine trypanosomosis in central and western Punjab: Prevalence, haemato-biochemical response and associated risk factors. *Acta Tropica*, v. 138, p. 44–50, out. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X14002009>>.

SUSAN MADISON-ANTENUCCI, LAURA D. KRAMER, LINDA L. GEBHARDT, Elizabeth Kauffman. Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 33, n. 2, 2020. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/cmr/33/2/e00083-18.full.pdf>>.

SUZUKI, Koretoki *et al.* A Possible Treatment Strategy and Clinical Factors to Estimate the Treatment Response in *Babesia gibsoni* Infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 69, n. 5, p. 563–568, 2007. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/69.563?from=CrossRef>>.

TABOADA, Joseph; MERCHANT, Sandra R. Babesiosis of Companion Animals and Man. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 21, n. 1, p. 103–123, jan. 1991. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561691500115>>.

TAENZLER, Janina *et al.* Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs after topical administration of fluralaner spot-on solution. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 234, 31 dez. 2016. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1481-x>>.

TAMURA, Koichiro *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/mst197>>.

CONNOR, S.J. The contribution of satellite derived information to malaria stratification, monitoring and early warning. In: CONNOR, S. J.; FLASSE, S. P.; PERRYMAN, A. H.; THOMSON, M. C. *Geneva: World Health Organization*. [S.l: s.n.], 1997. p. 33.

THEILER, A. Equine malaria and its sequelæ. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 16, p. 97–127, jan. 1903. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0368174203800383>>.

THRUSFIELD, M. V. Chapter 17: Diagnostic testing. *Veterinary Epidemiology*. [S.l: s.n.], 2007. .

TORINA, Alessandra *et al.* A Geographical Information System Based Approach for Integrated Strategies of Tick Surveillance and Control in the Peri-Urban Natural Reserve of Monte Pellegrino (Palermo, Southern Italy). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 3, p. 404, 27 fev. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/3/404>>.

TRAPP, Silvia M. *et al.* Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*, v. 140, n. 3–4, p. 223–230, set. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401706002287>>.

TROTTEIN, François; TRIGLIA, Tony; COWMAN, Alan F. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and *Plasmodia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 74, n. 2, p. 129–141, nov. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166685195024891>>.

TROUGHTON, Danielle R.; LEVIN, Michael L. Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*, v. 44, n. 5, p. 732–740, 1 set. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/44.5.732>>.

TSATSARIS, Andreas *et al.* Species composition, distribution, ecological preference and host association of ticks in Cyprus. *Experimental and Applied Acarology*, v. 70, n. 4, p. 523–542, 7 dez. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10493-016-0091-9>>.

UILENBERG, G. *et al.* Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Veterinary Quarterly*, v. 11, n. 1, p. 33–40, jan. 1989. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.1989.9694194>>.

UILENBERG, Gerrit. Babesia—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 1–2, p. 3–10, maio 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401706000513>>.

VARGAS-HERNÁNDEZ, G. *et al.* Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, v. 186, n. 3–4, p. 254–260, maio 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711007266>>.

VENEZIANO, Vincenzo *et al.* Distribution and risk factors associated with Babesia spp. infection in hunting dogs from Southern Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 6, p. 1459–1463, set. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X17305836>>.

VOTÝPKA, Jan *et al.* Apicomplexa. *Handbook of the Protists: Second Edition*. [S.l.: s.n.], 2017. .

WARD, Michael P.; CARPENTER, Tim E. Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 3–4, p. 257–284, jun. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587700001331>>.

WEILAND, George. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, v. 20, n. 1–3, p. 43–48, mar. 1986. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304401786900919>>.

WHO. *Geographic information systems*. Disponível em: <[https://www.who.int/topics/geographic\\_information\\_systems/en/](https://www.who.int/topics/geographic_information_systems/en/)>.

ZAHLER, M. *et al.* ‘Babesia gibsoni’ of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitology*, v. 120, n. 4, p. S0031182099005557, abr. 2000. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182099005557](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182099005557)>.

ZAHLER, Monika *et al.* Characteristic genotypes discriminate between Babesia canis isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, v. 84, n. 7, p. 544–548, 25 jun. 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s004360050445>>.

ZEMTSOVA, Galina E. *et al.* Phylogeography of Rhipicephalus sanguineus sensu lato and its relationships with climatic factors. *Experimental and Applied Acarology*, v. 69, n. 2, p. 191–203, 22 jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10493-016-0035-4>>.

ZHANG, Guanshi *et al.* A dataset of distribution and diversity of ticks in China. *Scientific Data*, v. 6, n. 1, p. 105, 1 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41597-019-0115-5>>.

ZYGNER, Wojciech *et al.* Low T3 syndrome in canine babesiosis associated with increased serum IL-6 concentration and azotaemia. *Veterinary Parasitology*, v. 211, n. 1–2, p. 23–27, jun. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401715002137>>.