

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Diagnóstico Morfológico, Sorológico e Molecular de Agentes
Anaplasmatocae em Felinos Domésticos da Região Metropolitana do Rio
de Janeiro**

Andresa Guimarães

2013



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

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO, SOROLÓGICO E MOLECULAR DE
AGENTES ANAPLASMATACEAE EM FELINOS DOMÉSTICOS DA
REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

ANDRESA GUIMARÃES

Sob orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

e Co-orientação do Professor
Huarrisson Azevedo dos Santos

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas)

Seropédica, RJ
Agosto de 2013

636.8098153

G963d

T

Guimarães, Andresa, 1989-

Diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de agentes anaplasmatáceas em felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro / Andresa Guimarães - 2013.

62 f.: il.

Orientador: Cristiane Divan Baldani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas.

Bibliografia: f. 47-62.

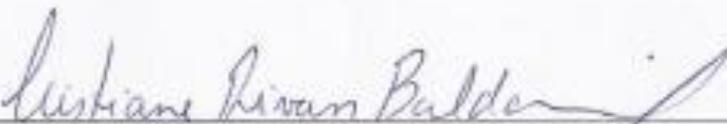
1. Gato - Doenças - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 2. Gato - Doenças - Diagnóstico - Teses. 3. Ehrlichia - Teses. 4. Anaplasmoses - Teses. I. Baldani, Cristiane Divan, 1978-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

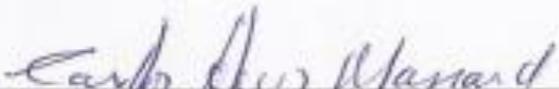
ANDRESA GUIMARÃES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/08/2013


Cristiane Divan Baldani (Ph. D) UFRRJ
(orientador)


Nádia/Regina Pereira Almosny (Ph. D) UFF


Carlos Luiz Massard (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Primeiramente, à Deus, por tudo que me proporcionou até hoje, pelas grandes oportunidades que surgiram no meu caminho e por me guiar em todos os momentos;

Aos meus pais Deise Luci de Araújo Guimarães e Ronaldo Guimarães, minha vizinha Zenith Barbosa de Araújo e meus irmãos Andréa Guimarães e Anderson Guimarães pelo apoio incondicional, por acreditarem e me incentivarem sempre e pelo carinho nos momentos difíceis, essa conquista também é de vocês;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, pela dedicação e orientação desde a graduação, por ser justa e compreensiva.

Aos meus familiares, amigos e colegas de profissão, que estiveram comigo, me apoiando e colaborando em diversas situações.

“Posso, tudo posso naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou para mim e ali estar

Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória

Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... Em Jesus”

Tudo posso
Pe. Fábio de Melo

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais Ronaldo Guimarães e Deise Luci de Araújo Guimarães, pelo apoio, amor e incentivo sempre.

À minha irmã Andréa Guimarães, minha melhor amiga, companheira de UFRRJ, por toda ajuda neste trabalho e na minha vida, amo você.

À minha vizinha Zenith Barbosa de Araujo, que além de todo apoio, sempre tinha uma palavra de conforto e um colo a oferecer.

Ao meu irmão Anderson Guimarães por acreditar e torcer por mim.

Ao meu namorado Agnaldo Machado de Andrade, pela ajuda no presente trabalho e pelo carinho e paciência dedicados a mim por todos esses anos.

Aos meus padrinhos e familiares pela torcida e carinho.

À Pandora e a todos os animais, razão da minha profissão.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, pelo exemplo de profissional e pessoa, sempre disposta a ajudar e pelo aprendizado nestes anos de convivência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Huarrisson Azevedo dos Santos, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao amigo Marcus Sandes Pires, pela inenarrável ajuda em cada etapa deste trabalho, sendo essencial para esta conquista, vou ser eternamente grata pela sua ajuda.

À Maristela Peckle Peixoto, pela imensa contribuição, sem a qual esse trabalho não seria realizado.

À Juliana Macedo Raimundo pela ajuda nas análises laboratoriais.

À Raisa Braul Rodrigues, “minha IC favorita”, pela ajuda em diversas etapas e pela companhia agradável.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard e aos amigos que frequentam o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (W.O. Neitz) do Departamento de Parasitologia Animal, Maristela Peckle Peixoto, Marcus Sandes Pires, Claudia Bezerra Silva, Joice Aparecida Rezende Vilela, Renata Lins, Gabriela Vivas Vitari, Aline Falqueto, Nelson Meireles da Silva, Larissa Correia de Amorim, Vanessa Raia, pela compreensão e auxílio na execução do presente estudo.

Aos amigos de profissão Camila Flávia Magalhães, Caio Balduino Rodrigues, Maria Lopes Correa, Juliana M. Raimundo e Raisa B. Rodrigues pela imensa ajuda nas coletas do teste piloto, cheias de emoção.

À Prof.^a Dr.^a Rosângela Zacarias Machado e Prof. Dr. Marcos Rogério André, pela acolhida em Jaboticabal, pelos ensinamentos, principalmente em biologia molecular, e por toda a contribuição essencial para realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Machado, pelos ensinamentos, colaboração e disposição em ajudar.

À Aline Tonussi e Cíntia Morgado, pela contribuição na leitura e correção desta dissertação.

Ao amigo Francisco Bernardes Melo, pela valiosa contribuição na correção deste trabalho.

Ao amigo de profissão Carlos Roberto Mendes Kling, pela oportunidade, confiança e pelo aprendizado fornecidos.

Às amigas Bruna Freire, Jenifer Souza, Tatiane Meira e Alessandra Araujo pelos bons momentos, conselhos e amizade sincera que me deram forças para essa conquista.

As amigas Ana Claudia Tavares Miranda e Gabrielli Stefaninni Santiago pelo apoio, torcida e grande auxílio desde a graduação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela qualidade de ensino e por proporcionar aprendizados e amigos que levarei por toda minha vida.

Aos membros da banca, prof. Dr. Carlos Luiz Massard, prof.^a Dr.^a Nádia Regina P. Almosny e Prof. Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca, pelas considerações e sugestões de grande relevância, que levaram ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária e aos seus professores, pela oportunidade e pelos ensinamentos oferecidos.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro deste projeto.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDRESA GUIMARÃES, filha de Ronaldo Guimarães e Deise Luci de Araujo Guimarães, nasceu em 21 de dezembro de 1989, no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Petrópolis e ensino médio no Centro Educacional Maurício Barroso.

Trabalhou como estagiária no ensino de Português e Matemática no Método de Ensino Kumon de 2003 a 2007.

Ingressou na Universidade Federal rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 2007, no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação fez estágio nas áreas de Reprodução de equinos, com o prof. Julio Ferraz Jacob, Estágio na área de Clínica e Cirurgia de grandes animais, realizado no Hospital Veterinário de Grandes Animais, além de estágio com pequenos animais na Clínica Veterinária Kling.

Foi bolsista de Iniciação Científica de 2008 a 2012, sendo de 2008 a 2010, bolsista balcão do CNPq, sob orientação do prof. Dr. Fernando Queiroz de Almeida, desenvolvendo pesquisas na área de Experimentação em Nutrição de Equinos Atletas, com o tema: Avaliação de diferentes metodologias para estimativa da digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos em equinos; de 2010 a 2011, bolsista PIBIC, sob orientação do prof. Dr. Carlos Luiz Massard, desenvolvendo a pesquisa: Aspectos hematológicos e soroepidemiológicos da anaplasose caprina e ovina na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro; e de 2011 a 2012, bolsista PROIC, sob orientação da prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, desenvolvendo a pesquisa: Investigação sorológica de *Ehrlichia canis* em felinos domésticos do Rio de Janeiro.

Concluiu a graduação em Medicina Veterinária em março de 2012, período em que ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), nível Mestrado, Patologia e Ciências Clínicas, também na UFRRJ, sob orientação da prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, sendo aprovada em primeiro lugar na classificação geral, desenvolvendo o tema: Diagnóstico sorológico e molecular dos agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos do Rio de Janeiro, com bolsa da CAPES.

Em 2013, foi aprovada no processo seletivo para mudança de nível de mestrado para doutorado pela CAPES.

Tem como produção dois artigos completos publicados em periódicos e 45 resumos publicados em anais de congressos, participa de projetos de dissertação e tese do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores e do PPGMV da UFRRJ.

RESUMO

GUIMARÃES, Andresa. **Diagnóstico Sorológico e Molecular dos Agentes Anaplasmataceae em Felinos Domésticos do Rio de Janeiro.** 2013. 62p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Estudos com felinos domésticos são pouco abordados no Brasil, principalmente em relação à pesquisa de hemoparasitoses, em que os gatos podem ser portadores do agente e contribuir para infecção do homem. Os agentes Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas que são encontradas em leucócitos, plaquetas ou eritrócitos, formando mórulas, características de sua infecção. A transmissão desses agentes para o homem e animais ocorre principalmente por vetores artrópodes. Como método diagnóstico ressalta-se a sorologia, porém estudos recentes utilizando diagnóstico molecular demonstram maior sensibilidade e especificidade, com melhor caracterização do agente. O presente estudo tem como objetivo diagnosticar felinos domésticos do Rio de Janeiro infectados naturalmente por agentes Anaplasmataceae (*Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp.) por meio de métodos sorológico e molecular, bem como avaliar as alterações hematológicas associadas a estas infecções. Foram utilizadas amostras de 216 animais, provenientes de clínicas localizadas em cidades da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. A pesquisa de anticorpos IgG anti-*E. canis* foi realizada pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a detecção molecular de *Ehrlichia* sp., pela nested Reação em Cadeia da Polimerase (nested-PCR) baseada no gene 16s *rRNA*. Os resultados demonstraram que 18 (8,3%) animais foram positivos na detecção direta pelo esfregaço sanguíneo, 57 (26,4%) soropositivos e 37 (17,1%) positivos na nested-PCR para *Ehrlichia* sp., sendo 91 (42,1%) considerados positivos para *Ehrlichia* sp. em pelo menos uma técnica. O diagnóstico de *A. platys* foi efetuado pela PCR em tempo real (qPCR) e nested-PCR baseada nos genes *gltA* e 16S *rRNA*, respectivamente. Dezessete animais (7,9%) apresentaram inclusões em plaquetas, oito (3,7%) foram positivos na qPCR, dois (0,9%) na nested-PCR e 23 (10,6%) animais foram considerados positivos para *A. platys* em pelo menos uma técnica. A pesquisa de *A. phagocytophilum* foi realizada por meio da qPCR baseada no gene *msp2*; no entanto, não foram observados animais positivos. Os achados hematológicos mais frequentes nos animais positivos para agentes Anaplasmataceae foram trombocitopenia, leucocitose, neutrofilia, desvio à esquerda regenerativo, anemia e hiperproteinemia. Apenas um animal apresentou co-positividade para ambos os agentes. Em relação aos dados associados, somente a idade interferiu na positividade para *Ehrlichia* sp., sendo na RIFI os animais mais jovens menos predispostos à infecção, ao contrário do observado na nested-PCR em que os mais jovens apresentaram maior índice de positividade. Apenas duas amostras positivas na nested-PCR para *E. canis* foram submetidas ao sequenciamento, sendo que uma sequência apresentou 100% de similaridade com isolados de *Ehrlichia* sp. e *E. canis* e a outra demonstrou 99% de similaridade com isolados de *Ehrlichia* sp. *ocelot* e *Ehrlichia* sp. *little-spotted-cat*. As duas amostras positivas na nested-PCR para *A. platys* apresentaram 100% de similaridade com isolados de *A. platys* previamente descritos. O presente trabalho demonstra, portanto, a ocorrência de agentes Anaplasmataceae na população de felinos domésticos do Rio de Janeiro.

Palavras chave: gatos, *Ehrlichia* sp., *Anaplasma platys*

ABSTRACT

GUIMARÃES, Andresa. **Serological Diagnosis and Molecular Agents Anaplasmataceae in Domestic Cats of Rio de Janeiro.** 2013. 62p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Studies of domestic cats are little discussed in Brazil, especially regarding hemoparasita research where cats can be carriers of the agent and contribute to infection of man. Anaplasmataceae agents are gram-negative bacteria found in leukocytes and platelets, in which morulae characteristic of the infection is observed. The transmission of these agents to humans and animals occurs by arthropod vectors. Sorologic diagnostic methods are emphasized, but recent studies using molecular techniques demonstrate greater sensitivity and specificity, with better characterization of the agent. The present study aims to diagnose domestic cats in Rio de Janeiro naturally infected by agents Anaplasmataceae (*Ehrlichia* sp., and *Anaplasma* sp.) by serological and molecular methods, as well as evaluate hematological changes associated with these infections to guide veterinarians in the diagnosis of these diseases. Samples of 216 animals from clinics located in cities in the metropolitan region of Rio de Janeiro were used. The research of antibodies IgG anti-*E. canis* was performed by Immunofluorescence Assay (IFAT) and molecular detection of *Ehrlichia* sp. by nested Polymerase Chain Reaction (PCR) based on 16S rRNA gene. The results demonstrate that 18 (8.3%) animals were positive in the direct detection by blood smear, 57 (26.4%) seropositive and 37 (17.1%) positive by nested-PCR for *Ehrlichia* sp., being 91 (42.1%) positive in at least one technique. The diagnosis of *A. platys* was performed by real-time PCR (qPCR) and nested-PCR based on 16S rRNA and *gltA* genes, respectively. Seventeen animals (7.9%) showed inclusions in platelet, eight (3.7%) were positive in qPCR, two (0.9%) in nested-PCR and 23 (10.6%) cats were considered positive for *A. platys* in at least one technique. The detection of *A. phagocytophilum* was performed by qPCR based on gene *msp2*, however, positive animals were not observed. The most common hematologic findings in animals positive for agents Anaplasmataceae were thrombocytopenia, leukocytosis, neutrophilia, regenerative left shift, anemia and hyperproteinemia. Only one animal showed co-positivity for both agents. Regarding the associated factor, only age interfered with positivity for *Ehrlichia* sp., in which younger IFAT positive animals were less prone to infection, unlike that observed in the nested-PCR in which the younger had higher positivity. Only two positive samples in the nested-PCR for *E. canis* were subjected to sequencing. One sequence demonstrated 100% similarity with isolates of *Ehrlichia* sp. and *E. canis* and another showed 99% similarity with isolates of *Ehrlichia* sp. *ocelot* and *Ehrlichia* sp. *little-spotted-cat*. The two positive samples in the nested-PCR for *A. platys* demonstrated 100% similarity with isolates of *A. platys* reported in advanced. The present work demonstrates the circulation of agents Anaplasmataceae in domestic cats in Rio de Janeiro.

Key words: cats, *Ehrlichia*, *Anaplasma platys*

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localização geográfica dos municípios do estado do Rio de Janeiro de obtenção das amostras de sangue de gatos domésticos-----	13
Figura 2. Esfregaço sanguíneo demonstrando uma inclusão em plaqueta sugestiva de agentes Anaplasmataceae (Corante rápido, 1000x)-----	19
Figura 3. Esfregaço sanguíneo demonstrando uma inclusão em monócito sugestiva de agentes Anaplasmataceae (Corante rápido, 1000x)-----	19
Figura 4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico de <i>E. canis</i> , sendo (a) controle positivo; (b) controle negativo e (c) amostra positiva de felino doméstico da Região Metropolitana do Rio de Janeiro-----	20
Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros visualizados na foto são relativos à nested-PCR para <i>Ehrlichia sp.</i> obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN/HE3. Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: Controle negativo; Canaleta 2: Controle positivo; demais Canaletas amostras de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro testadas, sendo as Canaletas 5 e 8 de animais positivos-----	21
Figura 6. Curva de amplificação do gene <i>gltA</i> de <i>Anaplasma platys</i> em gatos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. As linhas vermelhas representam os controles positivos e as linhas azuis e rosa representam três amostras positivas-----	23
Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros visualizados na foto são relativos à nested-PCR para <i>Anaplasma platys</i> obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores PLATYS e EHR16sR. Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: Controle positivo; Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Gato 105 e Canaleta 4 : Gato 176-----	23
Figura 8. Curva de amplificação do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em gatos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. A linha vermelha representam os controles positivos.-----	24

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das condições de termociclagem para as reações de PCR e nested PCR, utilizadas para detecção molecular de <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>E. canis</i> baseadas no gene 16S <i>rRNA</i> -----	15
Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das condições de termociclagem para as reações para as reações de PCR e nested-PCR, utilizadas para detecção molecular de <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Anaplasma platys</i> baseadas no gene 16S <i>rRNA</i> -----	17
Tabela 3. Frequência de felinos domésticos com inclusões em plaquetas e/ou leucócitos sugestivas de agentes Anaplasmataceae observadas em esfregaços sanguíneos corados por corante Rápido Panótico domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro-----	20
Tabela 4. Frequência de felinos domésticos positivos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i> domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro-----	21
Tabela 5. Frequência de felinos domésticos positivos pela nested-PCR para <i>Ehrlichia</i> sp. domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro-----	22
Tabela 6. Frequência de felinos domésticos positivos pela PCR em tempo real para <i>Anaplasma platys</i> domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro-----	24
Tabela 7. Resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo (ES), RIFI e nested-PCR para <i>Ehrlichia</i> sp. em amostras de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro-----	25
Tabela 8. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro positivos para <i>Ehrlichia</i> sp em pelo menos um teste de diagnóstico-----	26
Tabela 9. Associação entre os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo (ES), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Nested Reação em Cadeia pela Polimerase (nested-PCR) e achados hematológicos nas amostras positivas para <i>E. canis</i> obtidas de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro-----	27

Tabela 10. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, leucograma e trombograma de felinos domésticos do Rio de Janeiro em função do resultado positivo para *Anaplasma platys* em pelo menos um teste----- 29

Tabela 11. Associação entre os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo (ES) e PCR em tempo real (qPCR) e achados hematológicos nas amostras positivas para *A. platys* obtidas de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro-----30

Tabela 12. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro positivos para *Anaplasma platys* pela qPCR-----32

Tabela 13. Associação entre os dados de sexo, raça e idade com os resultados na detecção por esfregaço sanguíneo (ES), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Nested Reação em Cadeia pela Polimerase (nested-PCR) para *Ehrlichia* sp.----- 33

Tabela 14. Associação entre os dados de sexo, raça e idade com os resultados na detecção por esfregaço sanguíneo (ES) e Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) para *Anaplasma platys*-----34

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

A	Base purina Adenina
BAS	Número de basófilos
C	Base pirimidina Citosina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
C _q	Ciclo de quantificação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfato desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EOS	Número de eosinófilos
FIB	Fibrinogênio
G	Base purina Guanina
HB	Concentração de hemoglobina plasmática
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEM	Número de hemácias
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LEUC	Número de leucócitos
LINF	Número de linfócitos
MON	Número de monócitos
Nested-PCR	Nested Reação em Cadeia pela Polimerase
NEUT	Número de neutrófilos
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLAQ	Plaquetas
PPT	Proteína plasmática total
qPCR	PCR em tempo real
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
T	Base pirimidina Timina
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Infecções por Agentes Anaplasmataceae	3
2.2 Histórico da infecção por agentes Anaplasmatacea em felinos domésticos	3
2.3 Importância e distribuição	4
2.4 Transmissão, Ciclo Biológico e Mecanismos de defesa	5
2.5 Sinais clínicos, determinações laboratoriais e achados patológicos	7
2.6 Importância em saúde pública	7
2.7 Diagnóstico	8
2.7.1 Detecção direta por esfregaço sanguíneo	8
2.7.2 Isolamento em cultura de células	9
2.7.3 Testes sorológicos	9
2.7.4 Detecção molecular	10
2.8 Tratamento e profilaxia	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Animais	13
3.2 Coleta de Sangue	14
3.3 Análise Hematológica	14
3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	14
3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	15
3.5.1 Extração de DNA de sangue total	15
3.5.2 Reações de amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. baseadas no gene 16S <i>rRNA</i>	15
3.5.3 PCR em Tempo Real para <i>Anaplasma platys</i>	16
3.5.4 Reações de amplificação para <i>Anaplasma platys</i> baseadas no gene 16S <i>rRNA</i>	16
3.5.5 PCR em Tempo Real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	17
3.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose	17
3.6 Sequenciamento de Nucleotídeos e Caracterização Molecular dos Isolados	17
3.7 Cuidados para evitar contaminações	18
3.8 Análise Estatística	18

4 RESULTADOS	19
4.1 Esfregaços sanguíneos	19
4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	20
4.3 Reação de amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. pela PCR baseadas no gene 16S <i>rRNA</i>	21
4.4 Reações de amplificação para <i>Anaplasma platys</i> pela PCR em tempo Real baseada no gene <i>gltA</i> e pela nested-PCR baseada no gene 16S rRNA	22
4.5 PCR em Tempo Real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> baseado no gene <i>msp2</i>	24
4.6 Associação entre os resultados obtidos no esfregaço sanguíneo, RIFI e Nested-PCR para <i>Ehrlichia</i> sp.	24
4.7 Análise hematológica dos animais positivos para <i>Ehrlichia</i> sp.	25
4.8 Associação entre os achados hematológicos e os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo e PCR em tempo real para <i>Anaplasma platys</i>	28
4.9 Avaliação da Co-positividade para <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	33
4.10 Fatores associados à positividade para <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>A. platys</i>	33
4.11 Sequenciamento de Nucleotídeos e Caracterização Molecular dos Isolados	34
5. DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	46
7 BIBLIOGRAFIA	47

1 INTRODUÇÃO

A população de gatos domésticos no Brasil cresce a cada ano, inclusive mais rapidamente que a de cães. Isto se deve à tendência atual de moradias verticais, habitações menores e novos estilos de vida compatíveis com as características de felinos domésticos que se adaptam bem a apartamentos, não necessitam passear com o dono e são silenciosos. Acrescenta-se a isso o crescimento do mercado brasileiro de produtos e medicamentos desenvolvidos especialmente para estes animais domésticos, que movimenta milhões de reais por ano e gera renda para várias famílias.

Dentre as diversas doenças que acometem os gatos, as hemoparasitoses apresentam grande importância médica-veterinária devido aos sintomas causados pela infecção que, em casos agudos, podem levar a morte. Além da importância médica por se tratarem de zoonoses, a intensa convivência entre estes animais e o ser humano agrava ainda mais esta situação.

Com exceção dos hemoplasmas, os hemoparasitas dos felinos domésticos são pouco conhecidos no Brasil. Os agentes da Família Anaplasmataceae já foram relatados parasitando felinos domésticos e selvagens, com destaque para *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum*. Trata-se de bactérias gram-negativas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias que ao adentrarem em leucócitos ou plaquetas formam inclusões características, denominadas de mórulas.

Os agentes Anaplasmataceae têm ampla distribuição territorial, havendo relato de infecção em diversos países e em diferentes espécies de vertebrados. Porém, estudos envolvendo a infecção em felinos domésticos ainda são recentes, principalmente no Brasil, havendo apenas relatos esporádicos. Em geral, os gatos acometidos são assintomáticos, constituindo-se num risco maior por não serem identificados como portadores.

A erliquiose e a anaplasmoze felinas são transmitidas por vetores, com destaque para os carrapatos. Porém, ainda não se sabe ao certo quais os vetores no Brasil e as vias de transmissão da infecção natural, sendo provável que a exposição a artrópodes e a ingestão de roedores sejam as principais causas de infecção dos felinos. Vale ressaltar que a distribuição geográfica dos vetores tem influência direta sobre a prevalência da doença em uma determinada área.

O método diagnóstico mais utilizado para identificação da infecção por estes agentes é a detecção direta de mórulas em esfregaços sanguíneos, que, apesar de ser um método simples e prático, apresenta sensibilidade reduzida devido à baixa parasitemia em infecções naturais. Os testes sorológicos, por sua vez, são de grande valia principalmente em estudos epidemiológicos, porém reações cruzadas podem ocorrer dependendo do antígeno utilizado. As técnicas em biologia molecular, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a nested-PCR e a PCR em tempo real, vêm ganhando espaço por apresentarem alta sensibilidade e especificidade e, aliadas ao sequenciamento, permitem a caracterização genética dos agentes.

Apesar da importância destes agentes na infecção de felinos, poucos estudos são desenvolvidos no Brasil abordando esta temática. Portanto, tornam-se necessárias investigações a fim de melhor caracterizar os agentes da família Anaplasmataceae e os aspectos envolvidos na sua transmissão, patogênese e manifestação clínica em gatos domésticos no Rio de Janeiro.

O presente estudo tem como objetivo diagnosticar felinos domésticos no Rio de Janeiro infectados naturalmente por agentes Anaplasmatidae (*Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.) por meio de métodos sorológico e molecular, bem como avaliar as alterações hematológicas associadas a estas infecções.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções por Agentes Anaplasmataceae

As espécies pertencentes à família Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas, imóveis, intracelulares obrigatórias, cocóides a elipsoidais, residentes em fagossomos que causam doença no homem e animais. São organismos que se mantem na natureza através de interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (DUMLER et al., 2001; PADDOCK; CHILDS, 2003). Caracterizam-se por espécies filogeneticamente relacionadas, porém genética e antígenicamente diferentes (YU et al., 2006).

Em 2001, Dumler et al. reorganizaram os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*, como pertencentes à família Anaplasmataceae e à ordem Rickettsiales. Com isso, algumas espécies foram agrupadas em gêneros diferentes ao que pertenciam anteriormente. Essas mudanças foram baseadas em estudos moleculares que permitiram uma caracterização taxonômica mais precisa desses agentes. *Ehrlichia platys* e *E. bovis* passaram a ser denominadas de *A. platys* e *A. bovis*; as espécies *E. phagocytophila*, *E. equi* e o agente da Erliquiose Granulocítica Humana foram renomeados como espécie *A. phagocytophilum*, porém permaneceram como três cepas distintas. *Cowdria ruminantium* passou a ser *E. ruminantium*; e, *E. risticii* e *E. sennetsu* passaram a pertencer ao gênero *Neorickettsia* como *N. risticii* e *N. sennetsu* respectivamente.

Depois dessa reorganização, o gênero *Anaplasma* passou a conter as espécies *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*. O gênero *Ehrlichia* passou a ser composto por *E. ruminantium*, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris* e *E. ewingii*. Já o gênero *Neorickettsia* passou a conter as espécies *N. helminthoeca*, *N. risticii* e *N. sennetsu*, sendo que apenas *W. pipientis* permaneceu no gênero *Wolbachia*.

2.2 Histórico da infecção por agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos

A primeira descrição de *Ehrlichia canis* ocorreu em cães em 1935 (DONATIEN; LESTOGUARD, 1935), já o primeiro relato de erliquiose felina ocorreu na França por Charpentier e Groulade (1986) que observaram mórulas em células mononucleares de gatos. Na América Latina, o primeiro relato ocorreu no Brasil, em 1998, no Estado do Rio de Janeiro em um gato febril, com sintomas inespecíficos e mórulas em plaquetas observadas na microscopia (ALMOSNY et al., 1998). Já a primeira detecção molecular de *E. canis* em gatos na América Latina também foi no Brasil, em animais atendidos na rotina laboratorial do hospital veterinário da Universidade Federal de Viçosa, conforme relatado por Oliveira et al. (2009).

A trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT) foi primeiramente descrita em 1978, nos Estados Unidos (HARVEY et al., 1978) e sua etiologia foi atribuída a um microrganismo que infectava seletivamente as plaquetas. Os autores confirmaram, através de microscopia eletrônica, que as inclusões plaquetárias tratavam-se de vacúolos contendo organismos do tipo rickettsia, denominando o agente de *Ehrlichia platys*. Com o advento da biologia molecular, este organismo foi reclassificado como *Anaplasma platys* (DUMLER et al., 2001). O primeiro relato de inclusões sugestivas de *A. platys* em gatos no Brasil foi

observado por Santarém et al. (2005) em uma gata atendida no Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP, no Brasil.

Anaplasma phagocitophilum inicialmente foi identificado como agente da Erliquiose Granulocítica Humana, atualmente Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH), sendo denominado *Ehrlichia equi* em cavalos e *Anaplasma phagocitophilum* em ovelhas e outros ruminantes (FOGGIE, 1949; RISTIC; HUXSOLL, 1984; MADEWELL; GRIBBLE, 1982); porém estudos moleculares demonstraram ser o mesmo organismo (DUMLER et al., 2001). O primeiro relato da infecção de *A. phagocitophilum* em cães foi realizado em 1982 na Califórnia (MADEWELL; GRIBBLE, 1982) e desde então a anaplasmoze granulocítica tem sido identificada em várias espécies animais em diversas partes do mundo. No Brasil, o primeiro relato da infecção por este agente foi em cães do município de Seropédica, RJ, a partir de estudos moleculares (SANTOS et al., 2011). Porém, não há relatos de infecção em felinos domésticos no Brasil até o presente momento.

2.3 Importância e distribuição

Ehrlichia canis infecta células mononucleares do sangue, formando inclusões citoplasmáticas, denominadas de mórulas, podendo nos gatos ser encontrada em plaquetas, como observado em infecção experimental por Almosny et al. (1998). A erliquiose é amplamente estudada em cães por causar uma doença grave, a erliquiose monocítica canina, relacionada a um quadro de anemia, leucopenia e trombocitopenia (HUXSOLL et al., 1969; HUXSOLL et al., 1970; HARRUS et al., 1999).

A ocorrência de erliquiose felina no mundo varia bastante de acordo com a região estudada e a técnica de diagnóstico empregada. Na Espanha, dentre 235 gatos avaliados, 17,4% de gatos errantes e 18,4% dos gatos pets foram positivos em teste sorológico (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI) para *Ehrlichia* sp. (ORTUÑO et al., 2005). Por outro lado, em Barcelona, Tabar et al. (2008) encontraram apenas um animal positivo pela PCR para os gêneros *Ehrlichia/Anaplasma* em 100 felinos estudados. Já na América do Norte não há evidências sorológicas da detecção deste agente, exceto em casos isolados de animais doentes (LITTLE, 2010).

No Brasil, em Viçosa-MG, 20% (3/15) dos felinos amostrados foram positivos na PCR, havendo 99% de similaridade com a sequência homóloga comparada e 100% de similaridade com a sequência de *E. canis* obtida de cães doentes da mesma região, exceto pela sequência EU567024, que apresentou duas bases nucleotídicas diferentes, sugerindo a possibilidade de uma mesma cepa de *E. canis* infectando cães e gatos no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009). Já em São Luís-MA houve apenas 1% (2/200) de gatos positivos pela PCR para *Ehrlichia* sp. baseada no gene 16S rRNA, sendo uma amostra positiva para *E. canis* e outra positiva para *E. chaffeensis* na nested-PCR, porém ambas as amostras foram negativas na RIFI (BRAGA et al., 2012).

Anaplasma platys é um parasito intracelular obrigatório encontrado exclusivamente em plaquetas onde forma mórulas características de sua infecção (HARVEY et al., 1978). A primeira detecção de inclusões sugestivas de *A. platys* em gatos ocorreu no Brasil (SANTARÉM et al., 2005). E mais recentemente ocorreu a caracterização molecular do agente por Lima et al. (2010) em um felino doméstico com anorexia, apatia, anúria e constipação, onde observaram-se mórulas em plaquetas durante a leucometria específica. Em 2009, Dahroug detectou pela nested-PCR o DNA de *A. platys* em uma onça parda de cativeiro ao pesquisar felinos selvagens no Mato Grosso. Ainda no Brasil, Correa et al. (2011)

observaram 13,18% (12/91) dos gatos positivos utilizando a nested-PCR, demonstrando a susceptibilidade de felinos ao agente e que há necessidade de maiores estudos envolvendo esta rickettsia. E de acordo com a literatura consultada, não há outros relatos da ocorrência de *A. platys* em felinos domésticos ou selvagens, em outros países do mundo.

Anaplasma phagocytophilum, por sua vez, infecta granulócitos, predominantemente neutrófilos, onde também se reproduz formando mórulas. Já houve relatos de infecção no homem, cães, felinos, equinos e ruminantes, além de uma grande variedade de pequenos mamíferos silvestres, apesar dessa diversidade de hospedeiro variar de acordo com a região geográfica (BJOERSDORFF et al., 1999; PUSTERLA et al., 1999). Na Suécia, Bjoersdorff et al. (1999) descreveram o primeiro relato de erliquiose granulocítica felina por *A. phagocytophilum* confirmado pela PCR e pelo sequenciamento.

Não há confirmação de infecção em gatos no Brasil, no entanto, sua ocorrência em gatos domésticos nos Estados Unidos e em países da Europa é reportada (HEIKKILA et al., 2010; LAPPIN et al., 2004; TARELLO, 2005). Nos Estados Unidos, em regiões endêmicas, a soroprevalência chega a 30% (LITTLE, 2010). Na Flórida, dentre 553 gatos errantes, nove foram positivos para *A. phagocytophilum* pela PCR (LURIA et al., 2004). Em estudo conduzido por Billeter et al. (2007) avaliando gatos domésticos utilizando a RIFI, foi observado que o agente circula nos seguintes estados dos Estados Unidos: Flórida (12/90), Califórnia (3/23), Michigan (3/45) e Rhode Island (2/31); porém não houve detecção no Alabama (n=175) e Wisconsin (n=96) e também não houve positivos quando testados pela PCR. Já na Espanha, Solano-Galllego et al. (2006) observaram 1,8% de soropositividade utilizando a RIFI dentre os 168 animais estudados, porém estes animais foram negativos quando testados pela PCR.

Recentemente, Machado et al. (2012) detectaram *A. phagocytophilum* em aves selvagens no Brasil, sugerindo que estas podem carrear agentes Anaplasmataceae servindo como fonte de infecção a outros animais no Brasil. Além disso, foi relatada a detecção molecular de *A. phagocytophilum* em cães do município de Seropédica, RJ, demonstrando a real possibilidade da circulação deste agente zoonótico nesta área (SANTOS et al., 2011). Além disso, nosso grupo de pesquisa observou inclusões em plaquetas e neutrófilos características da família Anaplasmataceae em esfregaços sanguíneos de gatos do estado do Rio de Janeiro, associados à presença de trombocitopenia (GUIMARÃES et al., 2012).

2.4 Transmissão, Ciclo Biológico e Mecanismos de defesa

Os agentes Anaplasmataceae são transmitidos por vetores, sendo os carrapatos os maiores responsáveis pelas infecções por esses agentes. *Rhipicephalus sanguineus* é frequentemente associado à transmissão de *E. canis*, *A. platys* e *E. ewingii* (COHN, 2003). Já o gênero *Ixodes* spp. é responsável pela transmissão de *A. phagocytophilum* e os carrapatos *Amblyomma* spp. e *Dermacentor* spp. são transmissores de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (PREZIOSI; COHN, 2002).

Na erliquiose canina, a transmissão do agente ocorre quando o carrapato infectado inocula sua secreção salivar contaminada no local da picada ao se alimentar de cães (GROVES et al., 1975). No hospedeiro vertebrado, a infecção inicia-se nos corpos elementares que penetram nos monócitos e linfócitos, multiplicando-se posteriormente por divisão binária formando os corpos iniciais, que após 7 a 12 dias de incubação darão origem as mórulas. As mórulas são as únicas formas identificadas microscopicamente nos hospedeiros vertebrados (McDADE, 1990), reconhecidas por inclusões de aspecto compacto, formadas por agrupados de pequenas estruturas que variam de forma cocóide a elipsoidal

(RISTIC; HUXSOLL, 1984). A ruptura das células hospedeiras libera formas infectantes que dão continuidade exponencial ao processo ao atingir novas células. Uma ou mais mórulas podem estar infectando a mesma célula hospedeira (MARCONDES, 2009).

Na infecção por *Ehrlichia* sp. ocorre diversas recombinações nos genes das suas principais proteínas antigênicas, formando vários epítomos antigênicos distintos, que permitem a esses agentes escapar das defesas do organismo e manter infecções persistentes (REDDY; STRECK, 1999). A evasão do sistema imune é outro mecanismo pelo qual *E. canis* consegue se perpetuar no seu hospedeiro. Estudos *in vitro* indicaram uma diminuição na expressão de receptores do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de classe II (HARRUS et al., 2003).

O vetor da erliquiose canina é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, porém foi provado experimentalmente que o carrapato *Dermacentor* sp. também pode transmitir *E. canis* (JOHNSON et al., 1998). A transmissão do cão para o carrapato ocorre principalmente durante as duas a três primeiras semanas pós-infecção. Isto acontece porque na fase aguda da doença há um número maior de leucócitos contaminados na circulação (WOODY e HOSKINS, 1991). Os vetores infectados podem transmitir a doença por ao menos 155 dias após a infecção (NEER; HARRUS, 2006).

É digno de nota que os vetores da erliquiose felina não são totalmente conhecidos e também ainda não estão definidas as vias de transmissão da infecção natural, sendo provável que a exposição a artrópodes (carrapatos e pulgas) e ingestão de roedores sejam as principais formas de infecção dos felinos naturalmente infectados (BEAUFILS et al., 1999; LAPPIN, 2001; DAGNONE et al., 2001).

Na infecção por *A. platys* o período de incubação varia de oito a 15 dias. Na fase aguda da doença é possível observar grande quantidade de plaquetas infectadas no sangue. Com a multiplicação intensa do agente, após alguns dias, há queda brusca na contagem de plaquetas, atingindo valores de 20.000 plaquetas/ μ L ou menos, tornando-se pequena a chance de observação do parasita. Após o desaparecimento dos microrganismos, a plaquetometria volta ao normal em três ou quatro dias. De sete a 14 dias após o primeiro episódio, ocorre outra parasitemia seguida por trombocitopenia. Estes episódios ocorrem de forma cíclica e tendem a diminuir com o passar do tempo, levando à fase crônica da doença onde há aparições esporádicas do parasita e trombocitopenias moderadas (HIBLER et al., 1986; HARVEY, 1990; SWANGO et al., 1989; WOODY; HOSKINS, 1991).

O modo de transmissão de *A. platys* e o seu reservatório natural em felinos domésticos são desconhecidos, porém acredita-se que o *Rhipicephalus sanguineus* esteja envolvido em sua transmissão (STILES, 2000).

A transmissão de *Anaplasma phagocytophilum* ocorre por carrapatos do gênero *Ixodes* (MAGNARELLI et al., 1995; MITCHELL et al., 1996; CHANG et al., 2001; ESKOW et al., 2001), porém no Brasil existe a possibilidade de transmissão pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (SANTOS et al., 2011). *A. phagocytophilum* pode alternar entre duas formas, pequenas células densamente coradas, as quais se ligam a alvos na célula do hospedeiro, e células reticulares que se multiplicam intracelularmente e então se transformam em células densamente coradas que são liberadas quando a célula do hospedeiro se rompe (LAI et al., 2009; POPOV et al., 1998).

A. phagocytophilum, após entrada na célula, impede a fusão do fagolisossomo e causa bloqueio nos mecanismos oxidativos da respiração celular que são responsáveis pela eliminação dos organismos invasores (MOTT e RIKIHISA, 2000; WANG et al., 2002), garantindo a sobrevivência do agente e prejudicando a capacidade do hospedeiro de responder

a infecção. Vale ressaltar que em gatos o modo de transmissão e os vetores ainda não foram totalmente esclarecidos.

Uma única espécie de carrapato pode albergar mais de um agente, visto que um animal infectado pode estar infestado por carrapatos de mais de uma espécie e diferentes instares. Assim, é possível co-infecção, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento no animal doente (BREITSCHWERDT et al., 1998).

2.5 Sinais clínicos, determinações laboratoriais e achados patológicos

Os sinais clínicos e determinações laboratoriais de felídeos infectados por *E. canis* são variáveis e compreendem febre, apatia, anorexia, palidez de mucosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, aumento da atividade sérica das transaminases e fosfatase alcalina e hiperglobulinemia (ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY; MASSARD, 1999; STUBBS et al., 2000). Almosny e Massard (2002) observaram sinais de caquexia, emaciação, diarreia e distúrbio congestivo hemorrágico notável nos pulmões como achados anátomo-patológicos em felinos jovens inoculados experimentalmente com *E. canis*.

Em estudos com cães, foi observado que animais tratados no estágio agudo da doença, onde há presença da sintomatologia exacerbada, respondem bem ao tratamento, porém a eliminação do agente pode ser difícil e o animal torna-se cronicamente infectado, servindo de reservatório. O período de incubação da erliquiose em cães é de aproximadamente uma a três semanas (HARRUS et al., 1997b), após esse período, a doença evolui para os estágios agudo, subclínico e, em certos casos, crônico (HARRUS et al., 1997a). *Ehrlichia canis* possui predileção por células encontradas na microvascularização dos pulmões, rins e meninges (HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997a, b), sendo a epistaxis causada por hemorragias características dos pulmões ou da mucosa nasal (RIKIHISA, 1991).

Os animais infectados com *A. platys* são na maioria assintomáticos. As manifestações clínicas de cães experimentalmente infectados variam, sendo mais frequentemente observadas depressão, anorexia, letargia, emaciação, linfadenomegalia, palidez de mucosas e febre (HARRUS et al., 1997a). Os principais achados laboratoriais da infecção por *A. platys* são trombocitopenia, anemia (DAGNONE et al., 2003), macroplaquetas, monocitose e hipoalbuminemia (HARRUS et al., 1997a, KAKOMA et al., 2000). A severa trombocitopenia causada pelo agente se deve a diminuição da sobrevivência das plaquetas como consequência da multiplicação intensa deste organismo. No caso da cronicidade da doença, a remoção das plaquetas pode ocorrer por uma resposta imunomediada (STILES, 2000; WOODY; HOSKINS, 1991); outra hipótese para a trombocitopenia é a agregação plaquetária (GAUNT et al., 1990) Em gatos, os sintomas associados ainda não foram bem elucidados.

A infecção por *A. phagocytophilum* em gatos é caracterizada por febre, mialgias, dores articulares, linfadenomegalia, claudicação, doença periodontal, conjuntivite e sinais neurológicos (LITTLE, 2010). Em estudo com cães, foi observado que a maioria dos animais naturalmente infectados permanece saudável, como indicado por evidências sorológicas de exposição em áreas endêmicas, na ausência de um histórico de doença clínica (BEALL et al., 2008; FOLEY et al., 2001). Porém, no caso de doença com manifestação clínica os achados são hiperestesia, mialgia, artralguas, rigidez de pescoço, claudicação, incoordenação, neutrofilia com desvio a esquerda, linfopenia, além de outros sinais clínico-laboratoriais comuns à erliquiose canina (BJOERSDORFF et al., 1999; TARELLO, 2005).

2.6 Importância em saúde pública

Gatos domésticos podem ser reservatórios para erliquias que infectam outros animais, inclusive humanos (STUBBS et al., 2000). *Ehrlichia canis* foi descrita como uma zoonose capaz de causar doença grave em humanos, com casos de óbito principalmente em crianças, imunocomprometidos e idosos (PEREZ et al., 2006). Quadros clínicos diversos são relatados em pessoas com sorologia positiva para *E. canis* ou infectadas por microrganismo semelhante à *E. canis*, como febre, mialgia, fraqueza e confusão mental (DORAN et al., 1989; FISHBEIN et al., 1987; GOLDEN et al., et al., 1989; MAEDA et al., 1987).

A. platys tem potencial zoonótico, tendo sido observado inclusões sugestivas em plaquetas de humanos (ARRAGA, 1999). Recentemente, houve a detecção molecular de *A. platys* em co-infecção com *Bartonella henselae* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* em uma médica veterinária, causando dores de cabeça, doença repentina incluindo status epilético e outras anomalias neurológicas e neurocognitivas (MAGGI et al., 2013), reforçando a importância deste agente em saúde pública.

A detecção de *A. phagocytophilum* é de significativa importância em saúde pública, já que sabidamente é uma zoonose. A Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH) é caracterizada por uma doença febril semelhante à gripe que ocorre após a picada por carrapatos (BAKKEN et al., 1996), sendo geralmente leve e auto-limitante. Também pode causar fadiga, dores articulares, dor de cabeça, mialgia e febre (STEERE et al., 1983; AGUERO-ROSENFELD et al., 1996; BAKKEN et al., 1996; PETROVEC et al., 1997). Como achados da AGH pode-se relatar depleção linfóide esplênica, agregados de macrófagos e apoptose no fígado, hiperplasia paracortical e células hemofagocíticas dentro dos tecidos do sistema fagocitomononuclear (LEPIDI et al., 2000). Manifestações neurológicas já foram descritas em pessoas com AGH, quando o organismo foi detectado no fluido cefalorraquidiano (LEE et al., 2000). Análises laboratoriais de sangue periférico normalmente não revelam alterações hematológicas. No entanto, pode ser observada uma leve leucopenia associada a trombocitopenia ou às vezes um desvio neutrofílico à esquerda, como também um leve a moderado aumento na atividade das transaminases hepáticas (BAKKEN; DUMLER, 2008; BAKKEN et al., 1996a; DUMLER et al., 2007). A forma grave da doença tende a ocorrer em humanos de idade avançada, ou naqueles com doença imunossupressora concomitante ou terapia medicamentosa.

Nos Estados Unidos, o quadro de prevalência de doenças transmitidas por carrapatos apresenta a AGH e a Erliquiose Monocítica Humana (EMH), causada por *E. chaffeensis*, respectivamente, como a terceira e a quarta doenças transmitidas por carrapatos mais comuns no país, atrás somente da Doença de Lyme e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (DUMLER, 2005). No Brasil houve relatos de casos suspeitos de EMH em Minas Gerais, onde se observaram títulos de anticorpos para *E. chaffeensis* em dois pacientes com sintomatologia clínica (CALIC et al., 2005) e em 1,2% (9/771) pacientes com doença febril atendidos em hospitais de Juiz de Fora, MG (COSTA et al., 2006).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Detecção direta por esfregaço sanguíneo

O diagnóstico laboratorial dos agentes da família Anaplasmataceae é realizado rotineiramente pela identificação direta de mórulas em esfregaços sanguíneos. Apesar de ser uma técnica rápida e prática, na maioria dos casos de infecção natural, não é totalmente confiável, já que a parasitemia é variável e, geralmente, um pequeno número de células são infectadas (NAKAGHI et al., 2008).

Deve-se levar em conta também a possibilidade de outros diagnósticos diferenciais, como inclusões virais, *Leishmania donovani*, *Hepatozoon canis*, *B. canis* e *B. gibsoni* fagocitadas e/ou sobrepostas serem confundidas com inclusões de agentes Anaplasmataceae (NEITZ; THOMAS, 1938). Além disso, precipitados de corantes e artefatos sobre os leucócitos podem ser confundidos com estruturas características desses agentes (DAGNONE et al., 2001).

Como alternativa para aumentar a sensibilidade do diagnóstico microscópico, a literatura propõe a confecção do esfregaço sanguíneo a partir da primeira gota de sangue periférico, com a justificativa de que essa gota contém muito mais mononucleares do que as gotas seguintes (NEITZ; THOMAS, 1938).

Além do esfregaço sanguíneo convencional e de capa leucocitária, o uso do diagnóstico citológico de linfonodos pode levar a um diagnóstico definitivo na fase aguda da doença (MYLONAKIS et al., 2003).

Nos cães, sabe-se que é importante pesquisar mais atentamente as inclusões granulocíticas e adotar algum outro método de diagnóstico que não seja apenas a detecção por esfregaço sanguíneo, pois *E. ewingii* apresenta inclusões semelhantes as de *A. phagocytophilum*. Assim, em gatos tal sugestão também se torna válida (GOLDMAN et al., 1998).

2.7.2 Isolamento em cultura de células

O isolamento de *E. canis* em culturas de células demonstrou ser o método mais sensível e definitivo para o diagnóstico inicial da erliquiose, porém requer muito tempo para a obtenção de resultados positivos, cerca de 14 a 34 dias. Também necessita de estrutura física, profissional experiente e equipamentos adequados, inviabilizando seu uso como método de diagnóstico de rotina (IQBAL et al., 1994). Porém, o cultivo celular ainda é considerado a modalidade mais sensível de diagnóstico para detecção de infecção aguda em pacientes humanos (AGUERO-ROSENFELD et al., 2002).

Para o isolamento de *E. canis* já foi descrita inoculação em células do tipo macrófagos de linhagem de camundongos BALB/C (KEYSARY et al., 2001), células originárias de histiocitoma canino DH82 (AGUIAR et al., 2007), uma linhagem de células microvasculares de endotélio humano (DAWSON et al., 1993), monócito primário canino (HELMET et al., 1980) e macrófago peritoneal canino (STEPHENSON; OSTERMAN, 1977). Todas as cepas de *A. phagocytophilum* podem ser cultivadas *in vitro* na linhagem de células HL-60 humana. Este método é usado em pesquisas, mas não está comercialmente disponível, não sendo utilizado para fins de diagnóstico (GREENE, 2006).

2.7.3 Testes sorológicos

Há uma grande diversidade de testes sorológicos que podem ser utilizados no diagnóstico das infecções por agentes Anaplasmataceae. Estes são uma alternativa viável e de grande aplicação nos estudos de levantamento epidemiológico. Mas reações cruzadas podem ocorrer, já que as espécies de erliquias dividem antígenos em comum.

A sorologia pode fornecer resultados negativos durante a primeira semana de infecção, uma limitação destes testes que não detectam a infecção em sua fase aguda (WALKER; DUMLER, 1996; WANER et al., 2001; PADDOCK; CHILDS, 2003) e também não diferencia um quadro de infecção atual de um quadro de exposição sem infecção propriamente dita ou de uma infecção prévia (SHAW et al., 2001). Deve-se também levar em

consideração a variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos e ao antígeno utilizado (SHAW et al., 2001).

O teste padrão ouro das sorologias é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos Imunoglobulina G (IgG) anti-*E. canis*. Anticorpos IgG apresentam títulos consistentes havendo um aumento de quatro vezes na fase aguda, além de permanecerem circulantes por vários meses após eliminação do agente (BARTSCH; GREENE, 1996). Já os anticorpos Imunoglobulina M (IgM) não são considerados um indicador confiável de exposição, devido sua produção inconsistente durante a infecção (MCBRIDE et al., 2003).

A RIFI é considerada um bom método de diagnóstico, pois detecta anticorpos séricos em animais portadores ou com infecção crônica que mantém parasitemia baixa ou não detectável ao microscópio óptico (AGUIAR et al., 2007). Aliado a isso, é um método prático, simples e sensível e, comparada aos demais métodos de diagnóstico, não requer equipamentos caros, se tornando mais acessível para diagnóstico na rotina clínica e laboratorial. Porém, necessita de profissional experiente para a leitura das lâminas, o que torna o resultado subjetivo.

Uma alternativa bastante utilizada atualmente são os “kits” comerciais de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), pois fornecem um diagnóstico rápido e de baixo custo. Porém, esses testes são meramente qualitativos, oferecendo apenas resultados positivos e negativos, sem titulação. Não se observa diferença significativa entre RIFI e testes ELISA comerciais (HARRUS et al. 2002). Em um estudo comparando o “dot-blot ELISA” com a RIFI, foi observado que o “dot-blot ELISA” é tão sensível e específico para a detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis* quanto a RIFI, tanto em infecções naturais quanto em experimentais (NAKAGHI et al., 2004). Além de apresentar as vantagens da rapidez, não requer equipamentos caros, apresenta facilidade da leitura dos resultados, e proporciona um registro permanente (CADMAN et al., 1994; NAKAGHI et al., 2004).

O “Western Immunoblotting” é um teste com sensibilidade próxima a da RIFI, que identifica o agente através das digitais do seu perfil proteico imunogênico. Apresenta a vantagem de ter uma leitura objetiva, já que não sofre influência da subjetividade do operador. Também é mais específica, sendo utilizada para caracterizar e distinguir os diferentes organismos resolvendo os problemas de reação cruzada. Contudo, é uma técnica mais custosa e trabalhosa, que necessita de mais tempo e de tecnologia mais avançada que a RIFI, não sendo indicada para o diagnóstico na rotina clínica (ANDEREG; PASSOS, 1999; HARRUS et al., 2011).

Não há relatos de reação cruzada entre *A. platys* e *E. canis* utilizando a RIFI, entretanto pode ocorrer reação sorológica cruzada entre *A. platys* e *A. phagocytophilum* (GREENE, 2006). Reatividade sorológica cruzada entre *A. phagocytophilum* e *E. canis* também foi relatada, mas parece ser menos frequente (POITOUT et al., 2005; PLIER et al., 2009; BREITSCHWERDT et al., 1998).

2.7.4 Detecção molecular

As técnicas em biologia molecular ganham cada vez mais destaque, permitindo a detecção e a caracterização de novos patógenos (SANTOS et al., 2011). A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica amplamente aplicada em diversas áreas do diagnóstico molecular. É uma tecnologia flexível, que permite análise de uma grande variedade de amostras detectando uma sequência de interesse presente em uma amostra complexa de DNA (MOLINA; TOBO, 2004).

A nested-PCR é altamente sensível, pois é capaz de detectar 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis*, enquanto que uma só amplificação de DNA permite detectar apenas valores acima de 20 pg (WEN et al., 1997), sendo portanto uma alternativa mais sensível para detecção deste e outros agentes Anaplasmataceae.

Outra variante da técnica de PCR é a PCR multiplex, a qual é desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra, na mesma reação, pelo uso de mais de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Apresenta como vantagens a economia de tempo, reagentes, uso do termociclador, custo geral e ainda, pode facilitar estudos epidemiológicos moleculares que necessitem da triagem de um grande número de potenciais vetores e populações de reservatório (COURTNEY et al., 2004).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica capaz de fornecer resultados quantitativos, permite o acompanhamento da reação e a obtenção dos resultados de forma mais precisa e rápida em comparação à PCR convencional que apresenta resultados qualitativos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Além disso, é desnecessário o processamento pós-PCR como a eletroforese em gel de agarose. Através da avaliação do “CycleThreshold” (C_T) se consegue avaliar o ciclo exato onde a reação atinge o limiar de detecção e, com isso, comparar todas as amostras, sendo o sistema de detecção baseado na quantificação da fluorescência gerada durante a reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A qPCR é menos propensa a contaminações do que a PCR convencional e se houver algum tipo de contaminação esta é facilmente detectável através da análise das curvas de “melting” (PEREIRA, 2012). Dois sistemas de quantificação são utilizados de forma ampla e rotineira na técnica de qPCR, o SYBR[®] Green e o Taq Man[®].

O SYBR[®] Green é um método de detecção menos específico. Este corante se liga entre a fita dupla de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens de sua utilização são o baixo custo, a facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ocorrência de ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo resultar em uma superestimação da concentração do fragmento alvo. A fluorescência é realçada quando as moléculas do SYBR[®] Green estão ligadas na fita dupla do DNA, já as não-ligadas apresentam fluorescência fraca, produzindo um sinal mínimo que é subtraído durante a análise de computador (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A sonda Taq Man[®] é um fragmento molde de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um quencher (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'-3' da Taq DNA Polimerase (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). É um método de detecção específica porque, além da ligação do par de primers, é necessário que a sonda hibridize no fragmento a ser amplificado.

A Análise de “melting” em Alta Resolução (HMR) é uma técnica que utiliza a qPCR desenvolvida inicialmente para genotipagem, avaliando polimorfismo em um nucleotídeo único (WITTEWER et al., 2003). Essa técnica pode ser útil na diferenciação entre diferentes cepas e espécies dos agentes Anaplasmataceae.

Para a detecção de agentes Anaplasmataceae na PCR e seus derivados o gene 16s *rRNA* é amplamente utilizado no seu diagnóstico, identificação e genotipagem (OLSEN; WOESE, 1993; PEREZ et al., 2006). É um gene conservado encontrado em todas as espécies de bactérias. Produtos de PCR deste gene têm sido utilizados para análise de sequências das

espécies de *Ehrlichia*, no sentido de comparar as variações de cepas geograficamente dispersas (PEREIRA, 2012).

A identificação molecular de hemoparasitas seguida por sequenciamento de vários genes específicos tem sido utilizada para o diagnóstico dos agentes Anaplasmataceae, auxiliando na compreensão da doença e na identificação de reservatórios para espécies com potencial mórbido para seres humanos e animais domésticos. Os estudos abordando a detecção de DNA dos membros da família Anaplasmataceae em felinos domésticos ainda são escassos, havendo poucos relatos na América do Norte, Europa e Ásia (YIN-CHIACHUN et al., 2003; LAPPIN et al., 2004) e recentemente no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009; LIMA et al., 2010; CORREA et al. 2011; BRAGA et al., 2012).

O uso de técnicas específicas de diagnósticos, aliadas ao conhecimento dos agentes rickettsiais ocorrentes no Brasil permitirá avaliar se há ou não distinção entre os agentes que acometem humanos e animais domésticos.

2.8 Tratamento e profilaxia

Assim como na erliquiose canina, os fármacos de escolha para o tratamento de infecção por agentes Anaplasmataceae em felinos são a tetraciclina e a doxixiclina (ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY; MASSARD, 1999; BJOERSDORFF et al., 1999; LAPPIN et al., 2004; TARELLO et al., 2005). Animais com infecção crônica possuem prognóstico ruim, podendo apresentar melhora gradual ou nenhuma melhora após o tratamento, sendo que nos casos mais severos o tratamento prolongado é necessário (GREENE; HARVEY, 1990). Terapia suporte como fluidos, transfusão sanguínea, vitaminas, corticoides ou esteroides anabólicos podem ser utilizados (COHN, 2003).

A profilaxia deve tomar como base o controle efetivo dos carrapatos. No caso de transporte de animais de áreas endêmicas para áreas livres, estes devem ser testados e, se necessário, tratados anteriormente (HUXSOLL et al., 1970). Para que o animal sirva como doador de sangue, o ideal é que passe por triagem com testes sorológicos ou moleculares (REINE, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O estudo foi realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sendo coletadas 216 amostras de gatos domésticos oriundos de atendimento em Clínicas Veterinárias da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, sendo provenientes dos municípios de Duque de Caxias (n=14), Rio de Janeiro (n=99), Nova Iguaçu (n=39), Belford Roxo (n=8), São João de Meriti (n=21) e Mesquita (n=35) (Figura 1), de acordo com a disponibilidade e consentimento dos proprietários. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ, sob o processo 23083004088/2013-94. No momento da coleta de sangue foram observados dados relacionados ao hospedeiro (sexo, idade, raça, etc) utilizados posteriormente para avaliar possíveis associações com a positividade. Em seguida, houve uma divisão dos municípios em dois grupos: (1) Rio de Janeiro, composto por todos os animais da cidade do Rio de Janeiro, e (2) Baixada Fluminense, composto pelos gatos oriundos dos municípios de Belford Roxo, Duque de Caxias, Mesquita, Nova Iguaçu e São João do Meriti. De acordo com a Secretaria de Estado de Desenvolvimento da Baixada e da Região Metropolitana (SEDEBREM), a Baixada Fluminense é formada por 13 municípios, sendo: Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaguaí, Japeri, Magé, Mesquita, Nilópolis, Nova Iguaçu, Paracambi, Queimados, São João de Meriti e Seropédica, que juntos representam cerca de 33% do contingente populacional e 61% da área total da Região Metropolitana do Rio de Janeiro e 25% da população do Estado (IBGE, 2000). Já a capital, Rio de Janeiro, tem uma população de 6.320.446 habitantes com 39,5% da população do Estado e 1200,278 km², correspondendo a 3% do território total do Estado, fazendo desta, a cidade com maior densidade demográfica do Estado (IBGE, 2010).

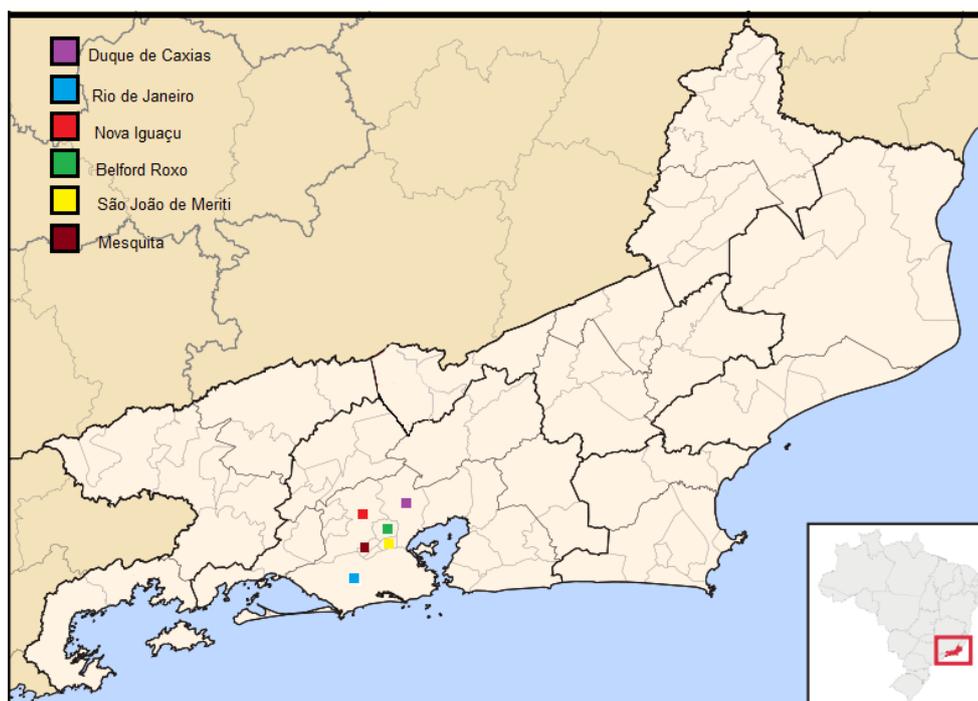


Figura 1. Localização geográfica dos municípios do estado do Rio de Janeiro de obtenção das amostras de sangue de gatos domésticos.

3.2 Coleta de Sangue

De cada animal foram coletadas amostras de sangue em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), através de venopunção cefálica ou jugular.

O sangue foi mantido refrigerado durante o transporte até o Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As amostras de sangue foram empregadas nas análises hematológicas e, posteriormente, alíquotas de plasma foram separadas por centrifugação e armazenadas a -20°C até o momento da realização do diagnóstico imunológico. O restante das amostras de sangue foi armazenado a -80°C para utilização nas análises de biologia molecular.

3.3 Análise Hematológica

A contagem global de leucócitos (Lt), hemácias (He) e plaquetas, as determinações dos teores de hemoglobina (Hb), volume globular (VG) e índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram realizados utilizando o contador automático de células Poch 100 (Roche), de acordo com as recomendações do fabricante.

A contagem diferencial de leucócitos (leucometria específica) e a análise da morfologia eritrocitária foram realizadas através de esfregaços de sangue total corados com corante rápido Panótico, analisados por microscópio óptico, objetiva de 100x, segundo Jain (1993). A pesquisa dos agentes foi realizada sob microscopia de luz (x100) nas lâminas coradas, observando em média 20 campos.

3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A detecção de anticorpos IgG anti-*Ehrlichia* sp. foi realizada com antígeno obtido a partir de cultura de células DH82 (derivadas de histiocitoma canino) infectadas com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, isolada a partir de um cão, fêmea, da raça Weimaraner, em fase aguda da doença (AGUIAR et al., 2007).

O suprimento de antígeno e os soros controles positivo e negativo foram gentilmente fornecidos pela professora Dr^a. Rosangela Zacarias Machado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), colaboradora do presente estudo.

A RIFI foi realizada segundo protocolo previamente descrito por André et al. (2010). As amostras de plasma dos felinos domésticos, bem como dos soros controles foram diluídas a 1:64 em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em seguida, 10µL do plasma diluído foi transferido para cada poço das lâminas contendo antígeno de *E. canis*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Em seguida, passaram por três lavagens de cinco minutos em solução salina de fosfato tamponada, PBS 10X pH 7,2, secas e a cada uma adicionados 10µL de conjugado (anti-IgG de gato, marcado pelo isotocianato de fluoresceína), diluído 1:32 em solução de PBS 1X pH7,2 com Azul de Evans, conforme orientação do fabricante (Sigma-Alodrich®). As lâminas foram incubadas novamente por mais 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia de luz ultravioleta (HUND WETZLAR). A positividade da reação

implicou na observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo.

3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

3.5.1 Extração de DNA de sangue total

As amostras de sangue colhidas em solução de EDTA foram submetidas ao processo de extração de DNA total com o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total foi utilizado como controle negativo 200 µL de água ultra-pura esterilizada (Invitrogen®) em cada bateria de amostras processadas. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.5.2 Reações de amplificação para *Ehrlichia* sp. baseadas no gene 16S *rRNA*

A detecção molecular de *Ehrlichia* sp. baseada no gene 16S *rRNA* foi realizada segundo protocolo descrito por Murphy et al. (1998), com pequenas modificações. Nas reações de PCR foram utilizados 5µL (aproximadamente 30ng/µL) de DNA da amostra, além de 1,25 UTAq DNA Polimerase (Life Technologies®), Tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Life Technologies®), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Life Technologies®) e água ultra-pura esterilizada (Life Technologies®) p.s.p. 25µL. Nas reações de nested-PCR, foram utilizados 1µL do produto amplificado da primeira reação de PCR, em um mix contendo os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação. Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições de termociclagem de cada reação estão representados na tabela 1. Amostras de DNA controle positivo de *E. canis*, obtidos a partir de células DH82 infectadas com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, foram gentilmente cedidas pela professora Rosângela Zacarias Machado.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das condições de termociclagem para as reações de PCR e nested PCR, utilizadas para detecção molecular de *Ehrlichia* sp. e *E. canis* baseadas no gene 16S *rRNA*.

Agente	Seqüência do oligonucleotídeo	Condições de Termociclagem (MURPHY et al., 1998)
<i>Ehrlichia</i> sp.	5' - GAACGAACGCTGGCGGCAAGC -3'	- 94°C por 3 minutos
- ECC	5' - CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3'	- 30 ciclos: 94°C por 1 minuto, 65°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos
- ECB		- 72°C por 5 minutos
Nested		
<i>E. canis</i>	5'-CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3'	- 3 ciclos: 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos e 72°C por 1,5 minutos
- ECAN-5	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'	- 37 ciclos: 92°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos e 72°C por 1,5 minutos
-HE3		

3.5.3 PCR em Tempo Real para *Anaplasma platys*

A reação para detecção molecular de *A. platys* pela PCR em tempo real foi realizada segundo protocolo desenvolvido no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da UFRRJ, sendo parte integrante do projeto intitulado “Agentes etiológicos da Família Anaplasmataceae em cães e carrapatos e sua Importância para Saúde Pública”, financiado pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) sob número de Processo E-26/110.199/2011.

As amostras de DNA total foram submetidas à amplificação do gene *gltA* de *A. platys* através do sistema TaqMan real-time PCR. As reações foram realizadas em volume final de 12µL contendo: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 10.8pmol dos *primers* 84f e 84r, 3pmol da sonda marcada na extremidade 5' com o *Reporter dye* FAM (6-carboxi-fluoresceína) e na extremidade 3' com o *Quencher* TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina), 3µL de amostra de DNA e água ultra pura em quantidade suficiente para completar 12µL de volume final. As reações foram realizadas no aparelho Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes condições de termociclagem: 52°C por 2 min, 95 °C por 10 min, e 45 ciclos a 95 °C por 15s, seguidos de 60°C por 1 min. As amostras com C_T inferior a 40 ciclos foram consideradas positivas.

3.5.4 Reações de amplificação para *Anaplasma platys* baseadas no gene 16S *rRNA*

As amostras positivas na PCR em Tempo Real para *A. platys* foram submetidas a nested-PCR, para posterior sequenciamento conforme protocolo descrito por Martin et al. (2005). Nas reações de PCR para *Anaplasma* sp. foram utilizados 5 µL de DNA amostra, em concentração média de 20ng/µl. Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições de termociclagem utilizados na PCR estão representados na tabela 2. Na reação foram utilizados 1,25 U Taq DNA Polimerase (Life Technologies®), Tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Life Technologies®), 3 mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 12,5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Life Technologies®) e água ultra-pura esterilizada (Life Technologies®) p.s.p. 25µL. Nas reações de nested-PCR foram utilizados 1µL do produto amplificado na primeira reação de PCR, em um mix contendo os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação. Amostras de DNA controle positivo de *A. platys* foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares, Universidade Federal de Goiás.

Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das condições de termociclagem para as reações para as reações de PCR e nested-PCR, utilizadas para detecção molecular de *Anaplasma* spp. e *Anaplasma platys* baseadas no gene 16S *rRNA*.

Agente	Seqüência do oligonucleotídeo	Condições de Termociclagem (MARTIN et al., 2005)
<i>Anaplasma</i> spp.		
- 8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	- 40 ciclos: 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto e 72°C por 100 segundos + 1 segundo/ciclo
- 1448R	5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3'	
Nested		- 72°C por 5 minutos
<i>Anaplasma platys</i>		
- PLATYS	5'-AAGTGCAACGGATTTTTGTC-3'	- 94°C por 1 minuto
-EHR16R	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'	- 40 ciclos: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos
		- 72°C por 5 minutos

3.5.5 PCR em Tempo Real para *Anaplasma phagocytophilum*

As amostras de DNA total foram submetidas à amplificação de 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum* através do sistema TaqMan real-time PCR, segundo protocolo descrito por Santos et al. (2011). As reações foram realizadas em volume final de 12µL contendo: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 10pmol dos *primers*903f e 1024r, 3pmol da sonda *939p*- (5'-TTAAGGACAACATGC TTGTAGCTATGGAAGGCA-3') (DRAZENOVICH et al., 2006) marcada na extremidade 5' com o *Reporter dye* FAM (6-carboxi-fluoresceína) e na extremidade 3' com o *Quencher* TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina), 3µL de amostra de DNA. As reações foram realizadas no aparelho Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes condições de termociclagem: 50°C por 2 min, 95 °C por 10 min, e 40 ciclos a 95 °C por 15s, seguidos de 60°C por 1 min. As amostras com C_T inferior a 40 ciclos foram consideradas positivas.

3.5.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados na PCR (item 3.5.2 e 3.5.4) foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 90 V/50 mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb (Life Technologies®). Os resultados foram visualizados e analisados através de transiluminador de luz ultravioleta acoplado ao analisador de imagem (L-pixtouch da Loccus Biotecnologia).

3.6 Sequenciamento de Nucleotídeos e Caracterização Molecular dos Isolados

Os produtos da amplificação das reações de PCR foram purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado através do método automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito

pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5µL do Tampão 2,5x (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂); 0,5µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5µL de água ultra-pura e 1,5µL de DNA (sendo este ajustado de acordo com sua concentração, mensurada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific). O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp Jaboticabal).

As seqüências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram submetidas a alinhamento e análise no Laboratório de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular (FCAV- UNESP Jaboticabal). A triagem foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes à cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. O programa CAP3 (<http://pbil.univ-77lyon1.fr/cap3.php>) foi utilizado para realizar o alinhamento da seqüência consenso. O programa BLAST foi utilizado para analisar as seqüências de nucleotídeos (BLASTn), objetivando-se procurar e comparar seqüências similares em banco de dados internacionais (GenBank) (BENSON et al., 2002) com aquelas obtidas.

3.7 Cuidados para evitar contaminações

Para verificar eventual contaminação dos reagentes e enzimas, um tubo contendo todos os componentes da PCR, com exceção da amostra de DNA, foi incluído em cada reação. A amostra de DNA foi substituída por uma quantidade equivalente de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®), caracterizando o controle negativo. Também em cada reação foi adicionado um tubo contendo DNA sabidamente positivo para validar a reação.

Foram utilizadas ponteiras com filtro em todas as fases do experimento, e os procedimentos de extração de DNA, e as reações de PCR foram realizadas em salas separadas. O preparo das reações e a pipetagem das amostras contendo DNA foram realizados em capela de fluxo laminar distintas, esterilizadas com luz ultravioleta imediatamente antes de cada reação. Todas as reações de PCR foram realizadas em sistema fechado.

3.8 Análise Estatística

Os valores de positividade para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma platys* obtidos através dos diferentes métodos de diagnóstico nos felinos do estudo foram avaliados em função das variáveis obtidas através do questionário epidemiológico: sexo, raça e idade e comparados através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância.

Os valores dos parâmetros hematológicos do grupo de felinos positivos e negativos para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma platys* do estudo foram submetidos a análise de variância e comparados através do teste F, em nível de 5% de significância, quando estes apresentaram distribuição normal. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Mann-Whitney em nível de 5% de significância, para efeito de comparação destes parâmetros entre o grupo de animais positivos e negativos para estes agentes. A frequência das alterações hematológicas no grupo de animais positivos e negativos foi comparada através do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado em nível de 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 4.0 (AYRES, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Esfregaços sanguíneos

Dentre os 216 gatos domésticos amostrados no presente estudo, 18 animais (8,3%) apresentaram nos esfregaços sanguíneos inclusões sugestivas de agentes Anaplasmataceae em leucócitos e/ou plaquetas (Figuras 2 e 3). A frequência de inclusões observadas somente em plaquetas (n=16) foi superior a observada em leucócitos (n=1, sendo em monócito) e, apenas um animal apresentou inclusões em leucócitos e plaquetas simultaneamente (sendo em plaqueta e neutrófilo). As frequências de animais positivos na detecção direta, em relação ao total de animais provenientes de cada município e nas diferentes regiões estudadas estão representadas na Tabela 3.

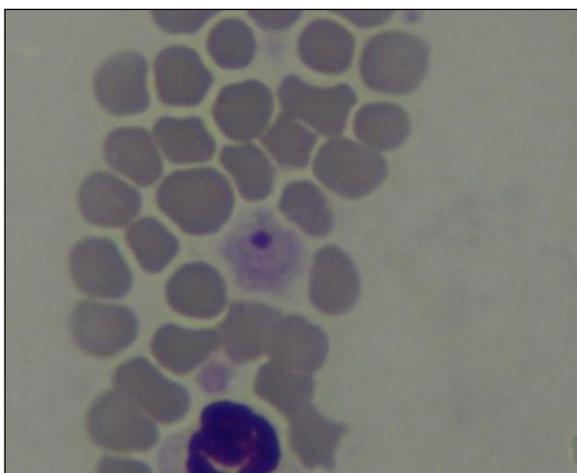


Figura 2. Esfregaço sanguíneo demonstrando uma inclusão em plaqueta sugestiva de agentes Anaplasmataceae (Corante rápido, 1000x).

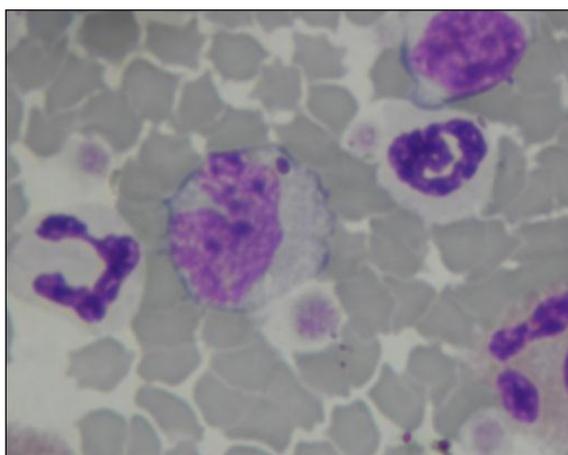


Figura 3. Esfregaço sanguíneo demonstrando uma inclusão em monócito sugestiva de agentes Anaplasmataceae (Corante rápido, 1000x)

Tabela 3. Frequência de felinos domésticos com inclusões em plaquetas e/ou leucócitos sugestivas de agentes Anaplasmataceae observadas em esfregaços sanguíneos corados por corante Rápido Panótico domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro.

Região	Município	Esfregaço sanguíneo		Total
		Positivos	Negativos	
Baixada Fluminense ^a	Belford Roxo	0 (0,0%)	8 (100,0%)	8
	Duque de Caxias	1 (7,1%)	13 (92,9%)	14
	Mesquita	0 (0,0%)	35 (100,0%)	35
	Nova Iguaçu	4 (10,3%)	35 (89,7%)	39
	São João de Meriti	3 (14,3%)	18 (85,7%)	21
		8 (38,1%)	109 (93,2%)	117
Rio de Janeiro ^a	Rio de Janeiro	10 (10,1%)	89 (89,9%)	99

^aValores seguidos de mesma letra não diferem significativamente através do teste Quiquadrado a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) demonstrou que 57 (26,4%) felinos domésticos foram soropositivos (Figura 4) no presente estudo. Destes, um animal era procedente do município de Belford Roxo, três a Duque de Caxias, 12 a Mesquita, 11 a Nova Iguaçu, 25 ao Rio de Janeiro e cinco a São João de Meriti. As frequências de animais soropositivos para a RIFI em relação ao total de animais proveniente de cada município e nas diferentes regiões estudadas estão representadas na Tabela 4.

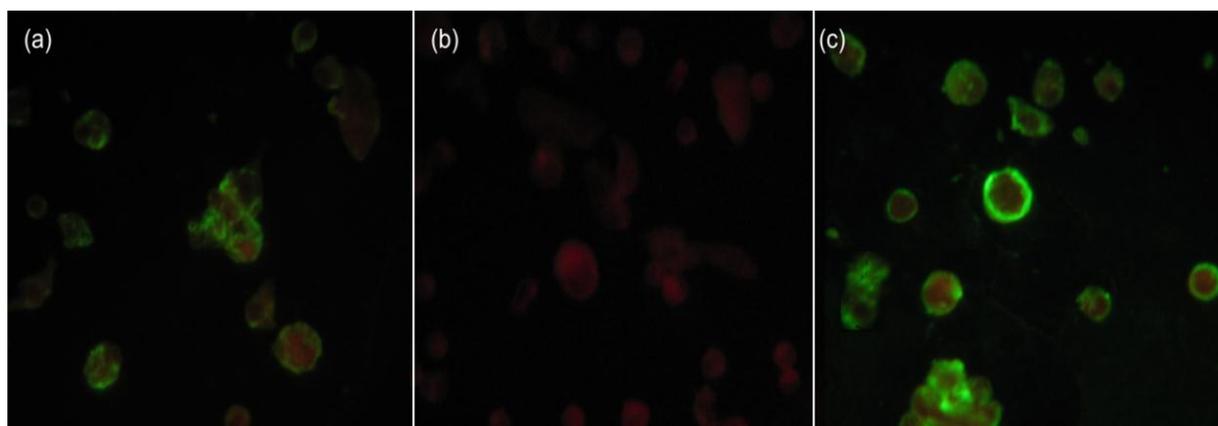


Figura 4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico de *E. canis*, sendo (a) controle positivo; (b) controle negativo e (c) amostra positiva de felino doméstico da Região Metropolitana do Rio de Janeiro

Tabela 4. Frequência de felinos domésticos positivos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis* domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro.

Região	Município	RIFI		Total
		Positivos	Negativos	
Baixada Fluminense ^a	Belford Roxo	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8
	Duque de Caxias	3 (21,4%)	11 (78,6%)	14
	Mesquita	12 (34,3%)	23 (65,7%)	35
	Nova Iguaçu	11 (28,2%)	28 (71,8%)	39
	São João de Meriti	5 (23,8%)	16 (76,2%)	21
			32 (27,3%)	85 (72,7%)
Rio de Janeiro ^a	Rio de Janeiro	25 (25,2%)	74 (74,8%)	99

^aValores seguidos de mesma letra não diferem significativamente através do teste Quiquadrado a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.3 Reação de amplificação para *Ehrlichia sp.* pela PCR baseadas no gene 16S *rRNA*

A detecção molecular de *Ehrlichia sp.* pela nested-PCR, baseada no gene 16s *rRNA*, demonstrou a presença de bandas gênero-específicas em 37 (17,1%) gatos domésticos (Figura 5). A distribuição de animais positivos por município foi: a) Belford Roxo (n=2); b) Duque de Caxias (n=3); c) Mesquita (n=7); d) Nova Iguaçu (n=7); e) Rio de Janeiro (n=12); f) São João de Meriti (n=6). A frequência de positivos na nested-PCR em relação ao total de animais proveniente de cada município e nas diferentes regiões estudadas estão representadas na Tabela 5.

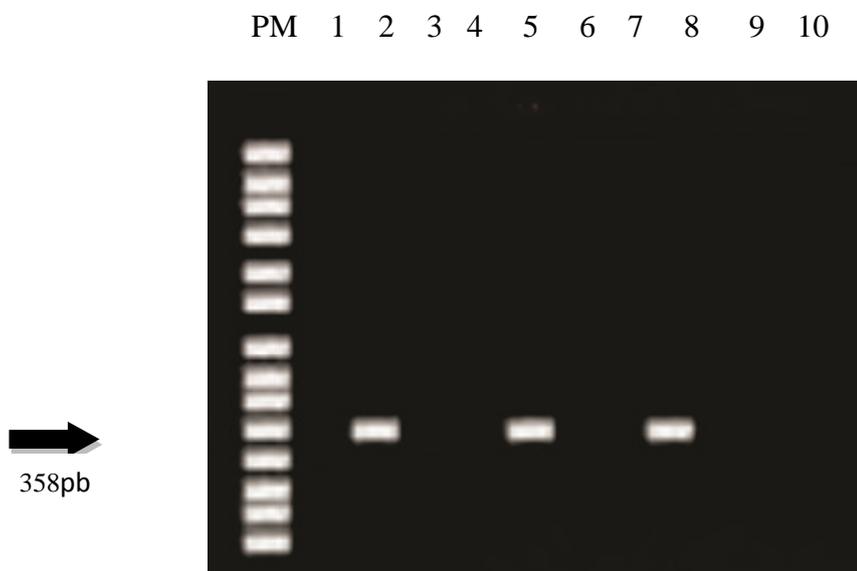


Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros visualizados na foto são relativos à nested-PCR para *Ehrlichia sp.* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN/HE3. Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: Controle negativo; Canaleta 2:

Controle positivo; demais Canaletas amostras de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro testadas, sendo as Canaletas 5 e 8 de animais positivos.

Tabela 5. Frequência de felinos domésticos positivos pela nested-PCR para *Ehrlichia* sp. domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro.

Região	Município	nested-PCR		Total
		Positivos	Negativos	
Baixada Fluminense ^a	Belford Roxo	2 (25,0%)	6 (75,0%)	8
	Duque de Caxias	3 (21,4%)	11 (78,6%)	14
	Mesquita	7 (20,0%)	28 (80,0%)	35
	Nova Iguaçu	7 (19,9%)	32 (82,1%)	39
	São João de Meriti	6 (28,6%)	15 (71,4%)	21
		25 (21,4%)	92 (78,6%)	117
Rio de Janeiro ^a	Rio de Janeiro	12 (12,1%)	87 (87,9%)	99

^aValores seguidos de mesma letra não diferem significativamente através do teste Quiquadrado a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.4 Reações de amplificação para *Anaplasma platys* pela PCR em tempo Real baseada no gene *glA* e pela nested-PCR baseada no gene 16S rRNA

Apenas oito (3,7%) animais foram positivos na PCR em tempo real para *A. platys*. O valor médio de C_T observado nos controles positivos foi de 22 ciclos e das amostras positivas de 34 ciclos (Figura 6). Do total de amostras positivas, uma amostra pertencia ao município de Belford Roxo, cinco pertenciam ao município do Rio de Janeiro e duas a São João de Meriti. As frequências de positivos na PCR em tempo real em relação ao total de animais proveniente de cada município e nas diferentes regiões estudadas estão representadas na Tabela 6.

As amostras positivas na PCR em tempo real foram submetidas à nested-PCR para amplificação de um fragmento de 676 pares de base espécie-específico para *A. platys*. Dentre estes, apenas dois (0,9%) gatos foram positivos na nested-PCR (Figura 7). Estas amostras foram purificadas e submetidas ao sequenciamento para posterior caracterização.

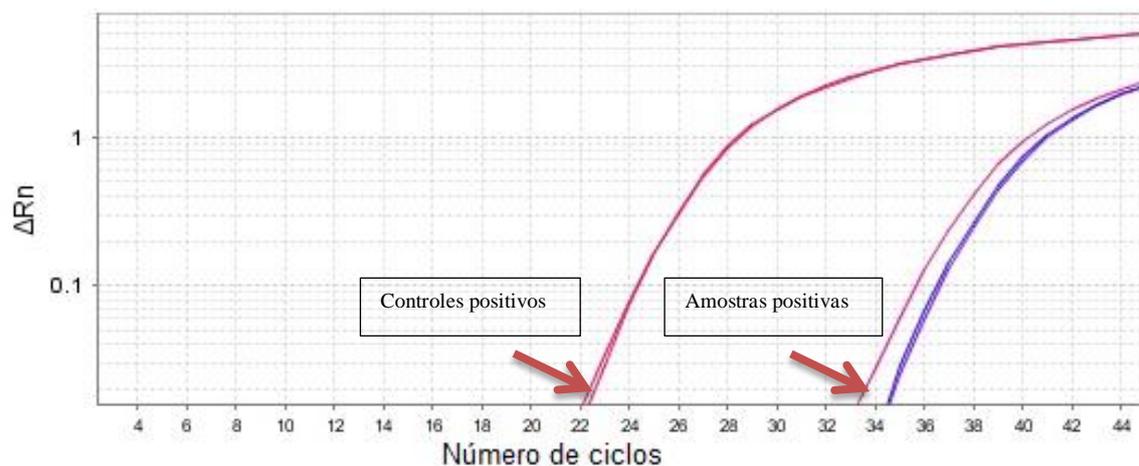


Figura 6. Curva de amplificação do gene *gltA* de *Anaplasma platys* em gatos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. As linhas vermelhas representam os controles positivos e as linhas azuis e rosa representam três amostras positivas.

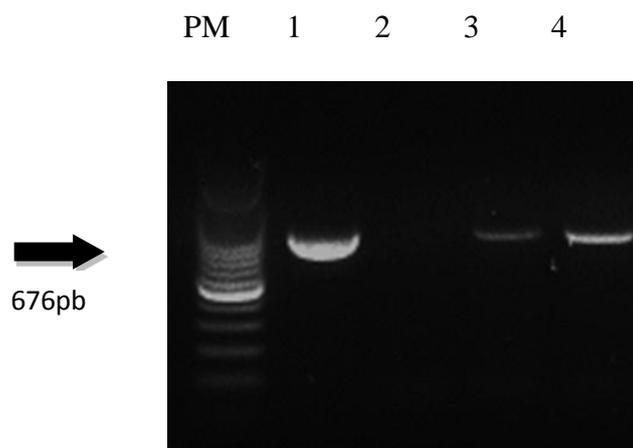


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros visualizados na foto são relativos à nested-PCR para *Anaplasma platys* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores PLATYS e EHR16sR. Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: Controle positivo; Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3: Gato 105 e Canaleta 4 : Gato 176.

Tabela 6. Frequência de felinos domésticos positivos pela PCR em tempo real para *Anaplasma platys* domiciliados nos municípios da região metropolitana do Rio de Janeiro e nas regiões Baixada fluminense e Rio de Janeiro.

Região	Município	PCR em tempo real		Total
		Positivos	Negativos	
Baixada Fluminense ^a	Belford Roxo	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8
	Duque de Caxias	0 (0,0%)	14 (100,0%)	14
	Mesquita	0 (0,0%)	35(100,0%)	35
	Nova Iguaçu	0 (0,0%)	39(100,0%)	39
	São João de Meriti	2 (9,5%)	19 (90,5%)	21
		3 (2,6%)	114 (97,4%)	117
Rio de Janeiro ^a	Rio de Janeiro	5 (5,1%)	94 (94,9%)	99

^aValores seguidos de mesma letra não diferem significativamente através do teste Quiquadrado a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.5 PCR em Tempo Real para *Anaplasma phagocytophilum* baseado no gene *msp2*

Não foi observado animais positivos na PCR em tempo real para *A. phagocytophilum* utilizando a técnica TaqMan-PCR, sendo o valor médio de C_T observado nos controles positivos de 19 ciclos, como demonstrado na Figura 8.

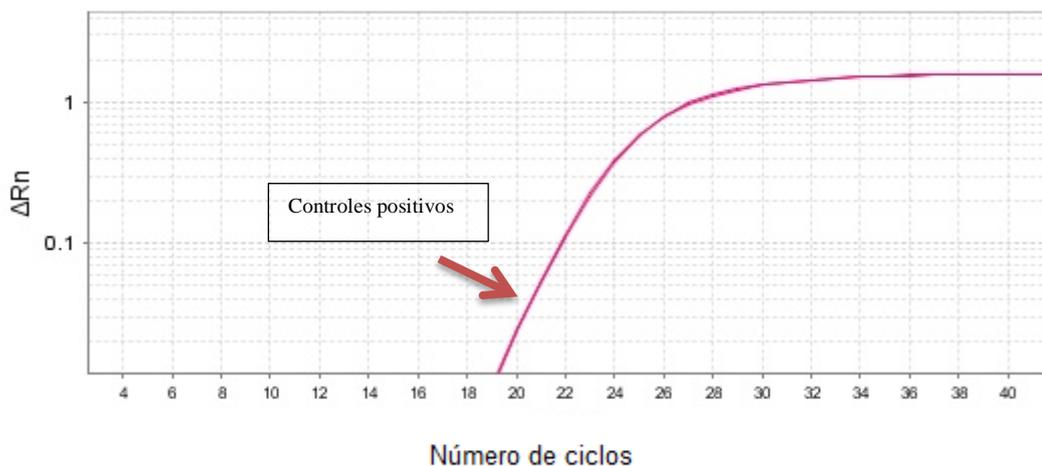


Figura 8. Curva de amplificação do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum* em gatos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. A linha vermelha representa os controles positivos.

4.6 Associação entre os resultados obtidos no esfregaço sanguíneo, RIFI e Nested-PCR para *Ehrlichia* sp.

Os resultados obtidos para as diversas técnicas de diagnóstico de *Ehrlichia* sp. utilizados no presente estudo estão representados na Tabela 7. Dentre os 216 animais avaliados no presente estudo, 5,6% (n=12) foram positivos para RIFI e nested-PCR, 3,7% (n=8) para nested-PCR e esfregaço sanguíneo, 1,9% (n=4) para RIFI e esfregaço sanguíneo e

1,4% (n=3) para as três técnicas. Do total de felinos domésticos avaliados pelo esfregaço sanguíneo, RIFI e pela nested-PCR, 91 (42,1%) gatos apresentaram-se positivos a pelo menos um teste e 125 (57,9%) foram negativos simultaneamente aos três testes.

Tabela 7. Resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo (ES), RIFI e nested-PCR para *Ehrlichia* sp. em amostras de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro

Técnica de diagnóstico	Positivos	Negativos
ES	18 (8,3%)	198 (91,7%)
RIFI	57 (26,4%)	159 (73,6%)
Nested-PCR	37 (17,1%)	179 (82,9%)
RIFI + ES	4 (1,9%)	145 (67,1%)
RIFI + nested-PCR	12 (5,6%)	134 (62,0%)
Nested-PCR + ES	8 (3,7%)	169 (78,2%)
ES + RIFI + nested-PCR	3 (1,4%)	125 (57,9%)

4.7 Análise hematológica dos animais positivos para *Ehrlichia* sp.

Os parâmetros médios do hemograma completo, incluindo eritrograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total dos felinos domésticos positivos para *Ehrlichia* sp., em pelo menos uma técnica realizada está apresentada na Tabela 8. Houve diferença significativa na média de neutrófilos segmentados, em que os animais positivos apresentaram média inferior aos negativos, mas ainda dentro dos valores de referência reportados para a espécie. Os demais parâmetros não diferiram entre si a 5% de significância.

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro positivos para *Ehrlichia* sp em pelo menos um teste de diagnóstico.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais**
						Mínimo	Máximo	
He (x10 ⁶ /mm ³)*	Positivo	91	6.97 ^a	2.57	0.27	1.28	11.05	5,0-10,0
	Negativo	125	6.83 ^a	2.23	0.20	0.99	11.15	
HB (g/dL)	Positivo	91	10.98 ^a	3.77	0.40	2.20	18.00	8,0-15,0
	Negativo	125	10.93 ^a	3.42	0.31	1.40	19.00	
HT (%)	Positivo	91	33.66 ^a	11.64	1.22	7.00	55.00	24-45
	Negativo	125	33.24 ^a	10.35	0.93	4.00	57.00	
VGM (fm ³)	Positivo	91	49.21 ^a	5.61	0.59	39.00	89.00	39-55
	Negativo	125	49.09 ^a	3.87	0.35	40.00	70.00	
CHGM (g/dL)	Positivo	91	32.66 ^a	1.40	0.15	28.00	35.00	31-35
	Negativo	125	32.86 ^a	1.31	0.12	27.00	35.00	
LEUC (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	17.74 ^a	11.85	1.24	3.10	73.90	5.5-19.5
	Negativo	125	21.94 ^a	20.26	1.81	0.90	198.00	
LINF (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	4.15 ^a	3.13	0.33	0.56	14.50	1.5-7
	Negativo	125	4.14 ^a	3.48	0.31	0.26	21.15	
MON (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	0.87 ^a	0.80	0.08	0.00	6.53	0.1-1.3
	Negativo	125	0.96 ^a	1.00	0.09	0.00	7.96	
BAST (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	0.67 ^a	0.86	0.09	0.00	4.43	0-0.3
	Negativo	125	0.77 ^a	1.09	0.10	0.00	6.50	
SEG (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	11.22 ^a	8.32	0.87	1.86	54.69	2.5-12.5
	Negativo	125	13.55 ^b	9.21	0.82	0.32	44.48	
EOS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	0.82 ^a	1.17	0.12	0.00	9.42	0-0.85
	Negativo	125	0.90 ^a	1.38	0.12	0.00	8.10	
BAS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0-0.15
	Negativo	125	0.02	0.14	0.01	0.00	1.43	
PLAQ (x10 ³ /mm ³)	Positivo	91	429.67 ^a	327.46	34.33	37.00	1346.00	300-900
	Negativo	125	412.91 ^a	321.03	28.71	15.00	1662.00	
PPT (g/dL)	Positivo	91	7.53 ^a	1.04	0.11	4.00	11.00	5,5-7,5
	Negativo	125	7.49 ^a	1.05	0.09	4.60	11.00	

*^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste ANOVA a 5% de significância (p<0,05). ^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância (p<0,05). HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; BAST: neutrófilos bastões; SEG: neutrófilos segmentados; EOS: Eosinófilos; BAS: basófilos; PLAQ: plaquetas; PPT: Proteína plasmática total; N: número de felinos domésticos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Schalm's (2010).

Avaliando os 91 animais positivos para *Ehrlichia* sp. em pelo menos um dos testes de diagnóstico empregados no presente estudo, as alterações hematológicas mais frequentemente observadas foram: trombocitopenia (n=46; 50,5%), leucocitose (n=31; 34,1%), neutrofilia (n=28; 30,8%), desvio a esquerda regenerativo (n=53; 58,2%), anemia (n=16; 17,6%) e hiperproteinemia (n=50; 54,9%). Na tabela 9 estão demonstrados a associação entre os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo, RIFI e nested-PCR e os achados hematológicos nas amostras positivas para *Ehrlichia* sp. É digno de nota, que apenas três (3,3%) animais apresentaram pancitopenia; a anemia associada à trombocitopenia foi observada em 12 (13,2%) animais. E, dentre os 16 animais com anemia, 14 apresentaram anemia normocítica normocrômica e apenas dois felinos anemia do tipo macrocítica hipocrômica.

É digno de nota, que os animais negativos apresentaram alterações hematológicas no hemograma completo (Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 9. Associação entre os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo (ES), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Nested Reação em Cadeia pela Polimerase (nested-PCR) e achados hematológicos nas amostras positivas para *E. canis* obtidas de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Teste	N	ES		RIFI		nested-PCR		ES/RIFI/nested-PCR	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Parâmetro hematológico	N	18	198	57	159	37	179	91	125
Anemia		2 (11,1%)	37 (18,7%)	9 (15,8%)	30 (18,9%)	9 (24,3%)	30 (16,7%)	16 (17,6%)	23 (18,4%)
DER		11 (61,1%)	111 (56,1%)	32 (56,1%)	90 (56,6%)	25 (67,6%)	97 (54,2%)	53 (58,2%)	69 (55,2%)
Eosinofilia		7 (38,9%)	60 (30,3%)	18 (31,6%)	49 (30,8%)	13 (35,1%)	54 (30,2%)	30 (33,0%)	37 (29,6%)
Hiperproteinemia		6 (33,3%)	81 (40,9%)	27 (47,4%)	60 (37,7%)	6 (16,2%)	81 (45,2%)	50 (54,9%)	37 (29,6%)
Hipoproteinemia		0 (0,0%)	5 (2,5%)	0 (0,0%)	5 (3,1%)	2 (5,4%)	3 (1,7%)	2 (2,2%)	3 (2,4%)
Leucocitose		6 (33,3%)	81 (40,9%)	17 (29,8%)	70 (44,0%)	13 (35,1%)	74 (41,3%)	31 (34,1%)	56 (44,8%)
Leucopenia		1 (5,5%)	12 (6,1%)	4 (7,0%)	9 (5,7%)	2 (5,4%)	11 (6,1%)	6 (6,6%)	7 (5,6%)
Linfocitose		3 (16,7%)	28 (14,1%)	6 (10,5%)	25 (15,7%)	6 (16,2%)	25 (14,0%)	13 (14,3%)	18 (14,4%)
Linfopenia		1 (5,5%)	38 (19,2%)	11 (19,3%)	28 (17,6%)	7 (18,9%)	32 (17,9%)	16 (17,6%)	23 (18,4%)
Monocitose		4 (22,2%)	36 (18,2%)	5 (8,8%)	35 (22,0%)	8 (21,6%)	32 (17,9%)	14 (15,4%)	26 (20,8%)
Monocitopenia		0 (0,0%)	9 (4,5%)	0 (0,0%)	9 (5,7%)	1 (2,7%)	8 (4,5%)	1 (1,1%)	8 (6,4%)
Neutrofilia		4 (22,2%)	76 (38,4%)	19 (33,3%)	61 (38,4%)	10 (27,0%)	70 (39,1%)	28 (30,8%)	52 (41,6%)
Neutropenia		1 (5,5%)	5 (2,5%)	2 (3,5%)	4 (2,5%)	1 (2,7%)	5 (2,8%)	2 (2,2%)	4 (3,2%)
Trombocitose		1 (5,5%)	20 (10,1%)	10 (17,5%)	11 (6,9%)	3 (8,1%)	18 (10,0%)	11 (12,1%)	10 (8,0%)
Trombocitopenia		10 (55,5%)	96 (48,5%)	29 (50,9%)	77 (48,4%)	14 (37,8%)	92 (51,4%)	46 (50,5%)	60 (48,0%)

N: número de felinos domésticos; DER: Desvio à esquerda regenerativo; ES: Esfregaço sanguíneo; RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; nested-PCR: nested Reação em cadeia pela Polimerase

4.8 Associação entre os achados hematológicos e os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo e PCR em tempo real para *Anaplasma platys*

Dezessete (7,9%) animais apresentaram inclusões sugestivas de agentes Anaplasmataceae em plaquetas na detecção direta pelo esfregaço sanguíneo e oito (3,7%) felinos domésticos foram positivos na PCR em tempo real para *A. platys*, sendo que dentre estes apenas dois (0,9%) apresentaram inclusões durante a pesquisa em esfregaço sanguíneo. Dentre os 216 felinos domésticos participantes do presente estudo, 23 (10,6%) apresentaram-se positivos para *A. platys* em pelo menos uma técnica diagnóstica.

Em relação aos parâmetros médios do hemograma completo, incluindo eritrograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total dos felinos domésticos positivos para *A. platys* em pelo menos uma técnica realizada, estão apresentados na Tabela 10. A média de linfócitos dos animais positivos foi maior que a média dos negativos, mas ainda dentro do valor de referência para felinos domésticos. Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística a 5% de significância. É digno de nota, que os animais negativos apresentaram alterações hematológicas no hemograma completo (Tabela 10).

Tabela 10. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, leucograma e trombograma de felinos domésticos do Rio de Janeiro em função do resultado positivo para *Anaplasma platys* em pelo menos um teste.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais*
						Mínimo	Máximo	
He (x10 ⁶ /mm ³)	Positivo	23	7.47 ^a	2.48	0.52	2.00	11.05	5,0-10,0
	Negativo	193	6.82 ^a	2.36	0.17	0.99	11.15	
HB (g/dL)	Positivo	23	11.73 ^a	3.48	0.72	3.50	16.40	8,0-15,0
	Negativo	193	10.86 ^a	3.57	0.26	1.40	19.00	
HT (%)	Positivo	23	35.60 ^a	10.71	2.23	11.00	52.00	24-45
	Negativo	193	33.16 ^a	10.91	0.79	4.00	57.00	
VGM (fm ³)	Positivo	23	48.49 ^a	3.90	0.81	41.00	55.00	39-55
	Negativo	193	49.22 ^a	4.76	0.34	39.00	89.00	
CHGM (g/dL)	Positivo	23	32.89 ^a	1.33	0.28	31.00	35.00	31-35
	Negativo	193	32.76 ^a	1.35	0.10	27.00	35.00	
LEUC (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	19.78 ^a	11.52	2.40	4.10	46.60	5.5-19.5
	Negativo	193	20.22 ^a	17.91	1.29	0.90	198.00	
LINF (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	5.86 ^a	4.65	0.97	0.66	20.50	1.5-7
	Negativo	193	3.95 ^b	3.09	0.22	0.26	21.15	
MON (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	0.82 ^a	0.43	0.09	0.00	1.60	0.1-1.3
	Negativo	193	0.93 ^a	0.96	0.07	0.00	7.96	
BAST (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	0.83 ^a	0.96	0.20	0.00	4.03	0-0.3
	Negativo	193	0.72 ^a	1.00	0.07	0.00	6.50	
SEG (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	11.30 ^a	6.81	1.42	1.90	24.86	2.5-12.5
	Negativo	193	12.72 ^a	9.13	0.66	0.32	54.69	
EOS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	0.97 ^a	0.93	0.19	0.00	4.19	0-0.85
	Negativo	193	0.85 ^a	1.34	0.10	0.00	9.42	
BAS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0-0.15
	Negativo	193	0.01	0.11	0.01	0.00	1.43	
PLAQ (x10 ³ /mm ³)	Positivo	23	416.00 ^a	325.53	67.88	37.00	1060.00	300-900
	Negativo	193	420.45 ^a	323.66	23.30	15.00	1662.00	
PPT (g/dL)	Positivo	23	7.36 ^a	0.83	0.17	6.00	9.20	5,5-7,5
	Negativo	193	7.52 ^a	1.07	0.08	4.00	11.00	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância (p<0,05). HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; BAST: neutrófilos bastões; SEG: neutrófilos segmentados; EOS: Eosinófilos; BAS: basófilos; PLAQ: plaquetas; PPT: Proteína plasmática total; N: número de felinos domésticos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. *Valores de referência segundo Schalm's (2010).

As alterações hematológicas mais frequentemente observadas nos animais positivos para *A. platys* foram: trombocitopenia (n=12; 52,2%), leucocitose (n=9; 39,1%), neutrofilia (n=7; 30,4%), desvio à esquerda regenerativo (n=16; 69,6%) e anemia (n=3; 13,0%), conforme demonstrado na tabela 11. Vale ressaltar que os três animais apresentaram anemia normocítica normocrômica e apenas um (4,3%) animal apresentou pancitopenia. Somente dois (8,7%) animais apresentaram anemia simultaneamente a trombocitopenia, e hiperproteinemia foi evidenciada em sete (30,4%) felinos.

Tabela 11. Associação entre os resultados obtidos pelo esfregaço sanguíneo (ES) e PCR em tempo real (qPCR) e achados hematológicos nas amostras positivas para *A. platys* obtidas de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Teste	N	ES		qPCR		ES/qPCR	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Parâmetro hematológico	N	17	199	8	208	23	193
Anemia		2 (11,8%)	37 (18,6%)	1 (12,5%)	38 (18,3%)	3 (13,0%)	36 (18,6%)
DER		11 (64,7%)	111 (55,8%)	7 (87,5%)	115 (55,3%)	16 (69,6%)	106 (54,9%)
Eosinofilia		6 (35,3%)	61 (30,6%)	5 (62,5%)	62 (29,8%)	10 (43,5%)	57 (29,5%)
Hiperproteinemia		5 (29,4%)	82 (41,2%)	3 (37,5%)	84 (40,4%)	7 (30,4%)	80 (41,4%)
Hipoproteinemia		0 (0,0%)	5 (2,5%)	0 (0,0%)	5 (2,4%)	0 (0,0%)	5 (2,6%)
Leucocitose		5 (29,4%)	82 (41,2%)	5 (62,5%)	82 (39,4%)	9 (39,1%)	78 (40,4%)
Leucopenia		1 (5,9%)	12 (6,0%)	0 (0,0%)	13 (6,2%)	1 (4,3%)	12 (6,2%)
Linfocitose		3 (17,6%)	28 (14,1%)	2 (25,0%)	29 (13,9%)	5 (21,7%)	26 (13,5%)
Linfopenia		1 (5,9%)	38 (19,1%)	0 (0,0%)	39 (18,7%)	1 (4,3%)	38 (19,7%)
Monocitose		4 (23,5%)	36 (18,1%)	2 (25,0%)	38 (18,3%)	5 (21,7%)	35 (18,1%)
Monocitopenia		1 (5,9%)	7 (3,5%)	0 (0,0%)	8 (3,8%)	1 (4,3%)	7 (3,6%)
Neutrofilia		4 (23,5%)	76 (38,2%)	4 (50,0%)	76 (36,5%)	7 (30,4%)	73 (37,9%)
Neutropenia		1 (5,9%)	5 (2,5%)	0 (0,0%)	6 (2,9%)	1 (4,3%)	5 (2,6%)
Trombocitose		1 (5,9%)	20 (10,1%)	1 (12,5%)	20 (9,6%)	2 (8,7%)	19 (9,8%)
Trombocitopenia		9 (52,9%)	97 (48,7%)	5 (62,5%)	101 (48,5%)	12 (52,2%)	94 (48,7%)

N: número de felinos domésticos; DER: Desvio à esquerda regenerativo; ES: Esfregaço sanguíneo; RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; nested-PCR: nested Reação em cadeia pela Polimerase

Os parâmetros médios do hemograma completo, incluindo eritrograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total dos felinos domésticos positivos para *A. platys* pela PCR em tempo real estão apresentados na Tabela 12. As médias de linfócitos, neutrófilos bastões e eosinófilos dos animais positivos foram superiores às médias dos negativos para a PCR em tempo real e acima do limite para a espécie. Os demais parâmetros não apresentaram diferença a 5% de significância. É válido ressaltar que, apesar de não haver diferença significativa, a média de leucócitos e neutrófilos segmentados dos animais positivos foi superior à dos negativos e acima do valor de referência para gatos.

Tabela 12. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro positivos para *Anaplasma platys* pela qPCR.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais*
						Mínimo	Máximo	
He (x10 ⁶ /mm ³)	Positivo	8	6.24 ^a	2.05	0.73	2.00	8.77	5,0-10,0
	Negativo	208	6.91 ^a	2.39	0.17	0.99	11.15	
HB (g/dL)	Positivo	8	10.01 ^a	3.07	1.09	3.50	12.40	8,0-15,0
	Negativo	208	10.99 ^a	3.58	0.25	1.40	19.00	
HT (%)	Positivo	8	30.25 ^a	9.18	3.24	11.00	38.00	24-45
	Negativo	208	33.54 ^a	10.95	0.76	4.00	57.00	
VGM (fm ³)	Positivo	8	49.25 ^a	4.33	1.53	41.00	55.00	39-55
	Negativo	208	49.14 ^a	4.69	0.33	39.00	89.00	
CHGM (g/dL)	Positivo	8	32.78 ^a	1.29	0.46	31.00	35.00	31-35
	Negativo	208	32.77 ^a	1.35	0.09	27.00	35.00	
LEUC (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	26.14 ^a	13.22	4.68	7.80	46.60	5.5-19.5
	Negativo	208	19.94 ^a	17.44	1.21	0.90	198.00	
LINF (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	7.73 ^a	5.94	2.10	3.12	20.50	1.5-7
	Negativo	208	4.01 ^b	3.13	0.22	0.26	21.15	
MON (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	0.96 ^a	0.35	0.12	0.60	1.44	0.1-1.3
	Negativo	208	0.92 ^a	0.94	0.06	0.00	7.96	
BAST (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	1.34 ^a	1.24	0.44	0.00	4.03	0-0.3
	Negativo	208	0.71 ^b	0.98	0.07	0.00	6.50	
SEG (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	14.68 ^a	7.41	2.62	2.96	24.55	2.5-12.5
	Negativo	208	12.49 ^a	8.96	0.62	0.32	54.69	
EOS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	1.43 ^a	1.27	0.45	0.29	4.19	0-0.85
	Negativo	208	0.84 ^b	1.30	0.09	0.00	9.42	
BAS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0-0.15
	Negativo	208	0.01	0.11	0.01	0.00	1.43	
PLAQ (x10 ³ /mm ³)	Positivo	8	308.75 ^a	319.49	112.96	46.00	1060.00	300-900
	Negativo	208	424.25 ^a	323.23	22.41	15.00	1662.00	
PPT (g/dL)	Positivo	8	7.58 ^a	1.03	0.36	6.00	9.20	5,5-7,5
	Negativo	208	7.50 ^a	1.05	0.07	4.00	11.00	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância (p<0,05). HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; BAST: neutrófilos bastões; SEG: neutrófilos segmentados; EOS: Eosinófilos; BAS: basófilos; PLAQ: plaquetas; PPT: Proteína plasmática total; N: número de felinos domésticos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. *Valores de referência segundo Schalm's (2010).

4.9 Avaliação da Co-positividade para *E. canis* e *A. platys*

Apenas um animal (0,5%) apresentou positividade para *E. canis* e *A. platys* simultaneamente, sendo positivo no PCR em tempo real para *A. platys* e na sorologia para *E. canis*. Nenhum animal foi positivo para ambos os agentes pelas técnicas de biologia molecular.

4.10 Fatores associados à positividade para *Ehrlichia* sp. e *A. platys*

Avaliando os dados de sexo, raça e idade em associação com os resultados de positividade para *Ehrlichia* sp. nas diferentes técnicas (Tabela 13), apenas a variável idade apresentou diferença a 5% de significância. Filhotes apresentaram menor positividade pela RIFI, em relação aos adultos e idosos. Por outro lado, pela nested-PCR observou-se maior frequência de positividade para filhotes.

Os dados referentes aos felinos positivos para *A. platys* pela PCR em tempo real estão demonstrados na Tabela 14. Não houve diferença entre as variáveis a 5% de significância.

Tabela 13. Associação entre os dados de sexo, raça e idade com os resultados na detecção por esfregaço sanguíneo (ES), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Nested Reação em Cadeia pela Polimerase (nested-PCR) para *Ehrlichia* sp.

		Teste	ES	RIFI <i>E. canis</i>	nested-PCR <i>E. canis</i>
		N	18	57	37
Sexo	Fêmeas	119	11 ^a (9,2%)	32 ^a (26,9%)	16 ^a (13,4%)
	Machos	97	7 ^a (7,2%)	25 ^a (25,8%)	21 ^a (21,6%)
Idade*	Filhotes	55	7 ^a (12,7%)	8 ^b (14,5%)	12 ^a (21,8%)
	Adultos	87	6 ^a (6,9%)	29 ^a (33,3%)	16 ^{ab} (18,4%)
	Idosos	46	2 ^a (4,3%)	13 ^{ab} (28,3%)	3 ^b (6,5%)
	NI	28	3 ^a (10,7%)	7 ^{ab} (25,0%)	6 ^{ab} (21,4%)
Raça	SRD	183	16 ^a (8,7%)	46 ^a (25,1%)	31 ^a (16,9%)
	CRD	27	2 ^a (7,4%)	10 ^a (37,0%)	4 ^a (14,8%)
	NI	6	0 ^a (0,0%)	1 ^a (16,7%)	2 ^a (33,3%)

*Filhotes 0 a 12 meses, adultos 13 a 84 meses e idosos acima de 85 meses. NI: não informado. ^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Quiquadrado a 5% de significância (p<0,05).

Tabela 14. Associação entre os dados de sexo, raça e idade com os resultados na detecção por esfregaço sanguíneo (ES) e Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) para *Anaplasma platys*

		Teste	ES	qPCR <i>A. platys</i>
		N	18	8
Sexo	Fêmeas	119	11 ^a (9,2%)	4 ^a (3,4%)
	Machos	97	7 ^a (7,2%)	4 ^a (4,1%)
Idade*	Filhotes	55	7 ^a (12,7%)	4 ^a (7,3%)
	Adultos	87	6 ^a (6,9%)	1 ^a (1,1%)
	Idosos	46	2 ^a (4,3%)	2 ^a (4,3%)
	NI	28	3 ^a (10,7%)	1 ^a (3,6%)
Raça	SRD	183	16 ^a (8,7%)	8 ^a (4,4%)
	CRD	27	2 ^a (7,4%)	0 ^a (0,0%)
	NI	6	0 ^a (0,0%)	0 ^a (0,0%)

*Filhotes 0 a 12 meses, adultos 13 a 84 meses e idosos acima de 85 meses. NI: não informado. ^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Quiquadrado a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.11 Sequenciamento de Nucleotídeos e Caracterização Molecular dos Isolados

Dentre as 37 (17,1%) amostras positivas na nested-PCR para *E. canis*, duas foram purificadas e submetidas ao sequenciamento do fragmento de 358pb para o gene 16S *rRNA*. Os resultados obtidos demonstraram que uma sequência do presente estudo apresentou 100% de similaridade com isolados de *Ehrlichia* sp. e *E. canis* (JN121380) e a outra demonstrou 99% de similaridade com isolados de *Ehrlichia* sp. *ocelot* (ANDRÉ et al., 2012) e *Ehrlichia* sp. *little-spotted-cat* (ANDRÉ et al., 2012).

As duas amostras positivas na nested-PCR para *A. platys* foram purificadas e submetidas ao sequenciamento do fragmento de 676pb para o gene 16S *rRNA*. As duas sequências obtidas apresentaram 100% de similaridade com isolados de *A. platys* previamente descritos.

Em função destes resultados, outras amostras serão submetidas ao sequenciamento visando à caracterização dos isolados deste estudo.

5. DISCUSSÃO

As doenças transmitidas por vetores artrópodes mostram-se cada vez mais presentes mundialmente, causando prejuízos econômicos, afetivos e em saúde pública. Os felinos domésticos são pouco estudados como hospedeiros desses agentes, apesar da estreita convivência com o homem. Com isso há necessidade de estudos para melhor caracterizar quais agentes estão presentes nesta população, sua prevalência, quais seus vetores e as vias de transmissão que afetam os felinos domésticos.

No presente estudo, os achados na detecção direta pelo esfregaço sanguíneo demonstraram inclusões características de agentes Anaplasmataceae em 18 animais (8,3%, n=216), sendo que 16 foram observadas em plaquetas, uma em monócito e um animal com inclusão em ambas as células. A detecção direta por esfregaço sanguíneo é um método de diagnóstico rápido, prático e amplamente utilizado na pesquisa de hematozoários. Porém, principalmente nos casos de infecção natural e dependendo do estágio desta, a parasitemia é baixa, dificultando a localização de células infectadas nos campos pesquisados (NAKAGHI et al., 2008). Além disso, alterações morfológicas nas células podem ser confundidas durante a leitura na microscopia, especialmente em plaquetas que apresentam densas granulações ou resquícios nucleares de megacariócitos, similares à mórulas (MYLONAKIS et al., 2003). Como diagnóstico diferencial deve-se considerar também as inclusões virais e de outros hemoparasitas fagocitados e/ou sobrepostos que podem ser confundidas com inclusões de agentes Anaplasmataceae (NEITZ; THOMAS, 1938). Adicionalmente, precipitados de corantes e artefatos sobre os leucócitos podem ser confundidos com estruturas características desses agentes (DAGNONE et al., 2001).

Neitz e Thomas (1938) propõe a confecção do esfregaço sanguíneo a partir da primeira gota de sangue periférico com a justificativa de que essa gota contém mais mononucleares do que as gotas seguintes. Porém Mylonakis et al. (2003) compararam o diagnóstico direto para *E. canis* a partir de diferentes tecidos, como sangue periférico (SP), capa leucocitária (CL), aspirados de medula óssea (MO) e linfonodo (LN) e constataram que esta técnica a partir de SP apresenta menor sensibilidade (8%) em comparação a CL (66%), MO (34%) e LN (60,9%), desencorajando seu uso para diagnóstico.

É válido ressaltar que os diferentes gêneros da família Anaplasmataceae podem parasitar células em comum. Assim, mórulas de *E. canis* podem ser observadas em plaquetas tanto em felinos (ALMOSNY, 1998), quanto em cães (RAMOS et al., 2009; DAGNONE, 2006; SOUSA, 2006). E, inclusões em plaquetas podem ser visualizadas nas infecções por *A. platys* e *E. canis*, assim como inclusões em granulócitos podem caracterizar infecção por *E. canis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* ou outro agente Anaplasmataceae, já que todos se caracterizam pela formação de mórulas.

A frequência de animais positivos através da detecção direta por esfregaço sanguíneo no presente estudo foi similar ao reportado por Correa et al. (2011), que observou 9,89% (9/91) de mórulas em plaquetas de gatos domésticos do Norte Fluminense e por Braga (2010), que relatou inclusões características de *Ehrlichia* sp. em 9,5% (19/200) dos gatos do Maranhão. Porém, considerando-se os fatores acima discutidos, a detecção direta por esfregaço sanguíneo não deve ser utilizada como única forma de diagnóstico.

Na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis* foram observados 57 (26,4%) felinos soropositivos. A RIFI é considerada o padrão ouro das sorologias para o diagnóstico de *E. canis*, especialmente em cães, pois detecta anticorpos séricos em animais portadores ou com infecção crônica que mantém parasitemia baixa ou não detectável ao microscópio óptico (AGUIAR et al., 2007). Sabe-se

que a infecção por *E. canis* determina títulos consistentes, havendo um aumento de quatro vezes na fase aguda, além de permanecerem circulantes por vários meses após eliminação do agente (BARTSCH; GREENE, 1996). Além disso, a RIFI é um método prático, simples e sensível e, comparada aos demais métodos de diagnóstico, especialmente os moleculares, não requer equipamentos caros, tornando-se mais acessível para diagnóstico na rotina clínica e laboratorial. Tal o fato, que a RIFI é bastante utilizada em levantamentos epidemiológicos e como método de triagem para o diagnóstico de diversas enfermidades.

Porém, resultados falso-negativos podem ser observados nos casos de infecção recente, onde o sistema imune ainda não produziu anticorpos contra o agente. A RIFI também não difere um quadro de infecção atual de um quadro de exposição sem infecção propriamente dita ou de uma infecção prévia (SHAW et al., 2001). Reações cruzadas também podem ocorrer, gerando resultados falso-positivos, já que as espécies de erliquias dividem antígenos em comum. Aliado a isso, deve-se considerar a variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos, ao antígeno utilizado e do profissional que realiza a leitura das lâminas, o que torna o resultado subjetivo. No presente estudo, foram utilizadas lâminas com o antígeno obtido a partir de cultura de células DH82 infectadas com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, sendo de qualidade comprovada e amplamente utilizados no diagnóstico da erliquiose em diversos estudos já realizados (AGUIAR et al., 2007; ANDRÉ et al., 2010; BRAGA et al., 2012; CASTRO et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008).

A partir da utilização da RIFI, como um dos métodos de diagnóstico, foi possível observar que a frequência de positividade foi superior ao observado por Braga et al. (2012), em gatos domésticos do Maranhão, que reportaram 5,5% (11/200) de animais soropositivos utilizando o mesmo protocolo e ponto de corte para a RIFI do presente estudo. No entanto, Ortuño et al. (2005) na Espanha, reportaram resultados semelhantes, onde foram avaliados 235 animais, sendo positivos na RIFI para *Ehrlichia* sp, 17,4% gatos errantes e 18,45% gatos domiciliados. Resultados superiores também foram observados por Stubbs et al. (2000) no Colorado, Estados Unidos, onde dentre os 22,1% (76/244) dos animais soropositivos apenas 13,2% (10/76) foram positivos para *E. canis* e 22,4% (17/76) positivos para *E. canis* e *N. risticii* simultaneamente. Aguirre et al. (2004), por sua vez, relatou soroprevalência inferior a observada neste estudo, onde 10,6% (13/122) felinos domésticos de Madrid foram soropositivos para *E. canis*. De modo semelhante, Solano-Gallego et al. (2006) na Espanha demonstraram que apenas 11,3%, dentre 168 felinos domésticos, foram soropositivos para RIFI. Por outro lado, Bouloy et al. (1994) evidenciaram resultados bem superiores, relatando uma soroprevalência de 82,4%. As diferenças de frequência de animais soropositivos para *Ehrlichia* observada entre os diversos estudos no Brasil e no mundo provavelmente estão associadas à distribuição dos vetores, ao clima de cada região e a sazonalidade dos vetores conforme a estação do ano, do número amostral avaliado, da população escolhida para estudo, da presença ou não de fatores associados ao local de criação ou habitat destes animais, como contato com outros animais, presença de ectoparasitos e acesso à rua e das limitações da técnica de diagnóstico utilizada, bem como da qualidade do antígeno em questão.

Na nested-PCR, para detecção de *Ehrlichia* sp baseada no gene 16s *rRNA*, foram observados 17,1% (37/216) de gatos domésticos positivos. A nested-PCR para *E. canis* é altamente sensível, capaz de detectar valores 100 vezes superiores à PCR convencional baseado no gene 16s *rRNA* de *Ehrlichia* spp. (WEN et al., 1997). Aguirre et al. (2008) demonstraram que a nested-PCR chega a ser 33% mais eficiente para a detecção de *E. canis* que a PCR convencional. Ramos et al. (2009) destacam a utilização da nested-PCR na pesquisa de *E. canis*, por ser sensível e específica na detecção deste patógeno. Porém, Machado (2004) testando as técnicas de PCR (gene *dsb*) e nested-PCR (gene 16s *rRNA*) em

cães naturalmente infectados por *E. canis* demonstrou que as duas técnicas são adequadas ao diagnóstico da erliquiose. A maior sensibilidade depende do alvo molecular utilizado na identificação da sequência do DNA de *E. canis* utilizado na PCR. Como desvantagem, a nested-PCR apresenta tempo de execução superior à PCR, além da possibilidade de falso-positivos devido à contaminação por produtos da PCR da primeira etapa (ALVES et al., 2005; MARSÍLIO et al., 2006; VINASCO et al., 2007).

A frequência de positivos na nested-PCR do presente estudo foi similar ao observado por Oliveira et al. (2009) que reportaram 20% (3/15) de positivos pela PCR para *E. canis* em felinos de Minas Gerais. Braga et al. (2012), por sua vez, relatou 1% (2/200) de gatos positivos para *Ehrlichia* sp. no Maranhão. De modo análogo, resultados inferiores foram relatados por Yin-Chiachun et al. (2003) no Taiwan, em que 11,76% (2/17) dos felinos foram positivos pela nested-PCR para *E. canis*. Já Tabar et al. (2007) observaram 1% (1/100) de gatos positivos pela PCR para os gêneros *Ehrlichia/Anaplasma* na Espanha. Como mencionado anteriormente, as diferenças observadas na frequência de positividade pela PCR nas diversas regiões provavelmente estão relacionadas às características geográficas e climáticas de cada região avaliada, da distribuição de possíveis vetores, particularidades de cada estudo e no gene alvo da PCR.

Na PCR em tempo real (qPCR) baseada no gene *gltA* para *A. platys*, 3,7% (8/216) dos felinos domésticos amostrados foram positivos. A qPCR ou PCR quantitativa permite a obtenção de resultados de forma rápida e simultânea à execução da reação, sendo mais precisa e rápida em relação à PCR convencional (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Acredita-se que em função disso, somente duas das oito amostras positivas na qPCR foram novamente positivas quando submetidas à nested-PCR baseada no gene 16S rRNA no presente estudo. A qPCR também é menos propensa à contaminações, consegue avaliar o ciclo (C_T) exato onde a reação atinge o limiar de detecção e não necessita de processamento pós-PCR. Adicionalmente, o sistema de sonda Taq Man®, utilizado no presente estudo, é um método altamente específico (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Os resultados obtidos pela qPCR no presente estudo foram inferiores ao observado por Correa et al. (2011) que reportou 13,18% (12/91) de felinos positivos na nested-PCR. É digno de nota que, na literatura consultada, este e o presente estudo são os únicos que abrangem um grande número de animais e a detecção molecular de *A. platys* em felinos domésticos, visto que apenas casos isolados de animais doentes foram relatados até o presente momento.

Não houve animais positivos para *A. phagocytophilum* pela qPCR baseada no gene *msp2*. A ausência de detecção de *A. phagocytophilum* pode ser esperada uma vez que o agente é raro no país, não tendo sido detectado até os dias atuais em felinos domésticos ou silvestres no Brasil. Esse resultado corrobora com os estudos de D'agnone (2006) que também não observou animais positivos ao testar cães de Jaboticabal-SP e Campo Grande-MS pela PCR baseada no gene *msp2*. Também Billeter et al. (2007) não obtiveram detecção molecular do agente em 460 felinos domésticos dos Estados Unidos apesar da soropositividade à RIFI (4,3%). Da mesma forma, na Espanha não houve detecção molecular de *A. phagocytophilum* apesar dos positivos na RIFI (6/122) (AGUIRRE et al., 2004). Aliado a isso, está o fato de que as principais proteínas de superfície, como a MSP ("Major Surface Protein") apresentam uma expressão diferencial quando sofrem pressão de seleção imune, o que resulta em variabilidade antigênica (CASPERSEN et al., 2002). Com isso, há divergência entre isolados de diferentes regiões geográficas, podendo acarretar em diagnóstico falso-negativo. Além disso, existe a possibilidade de infecção com baixa parasitemia, onde apesar do uso de técnicas sensíveis e específicas, a quantidade do parasita no organismo do animal hospedeiro é extremamente baixa que não é detectável. Também se especula que o parasita pode ser

sequestrado por outros tecidos, como o baço, não permanecendo presente no sangue (LAPPIN et al., 2004). Sabe-se que o agente circula no país, como relatado pelos estudos de Santos et al. (2011) com cães do município de Seropédica e Machado et al. (2012) com aves selvagens no Brasil. Com isso, estudos envolvendo um maior número de animais amostrados ou com histórico de contato com carrapatos poderiam criar uma caracterização molecular mais abrangente e definitiva, auxiliando desta forma no diagnóstico deste agente zoonótico no país.

Considerando-se a associação dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas utilizadas no presente estudo para o diagnóstico de *Ehrlichia* sp., do total de animais avaliados (216), 1,9% (n=4) foram positivos simultaneamente para RIFI e esfregaço sanguíneo, 5,6% (n=12) para RIFI e nested-PCR, 3,7% (n=8) para nested-PCR e esfregaço sanguíneo e 1,4% (n=3) para as três técnicas. Por outro lado, 11,6% (n=25) foram negativos à RIFI e positivos na nested-PCR. Segundo Nakaghi (2004), com base nestes achados, pode-se sugerir a fase da erliquiose em que se encontravam os animais naturalmente infectados. Sabe-se que em cães títulos de anticorpos estão presentes no soro a partir do 7º dia pós-infecção (TROY & FORRESTER, 1990) e que estes anticorpos podem estar presentes mesmo após a eliminação da *E. canis*, produzindo falso-positivos. Contudo, a nested-PCR pode detectar o parasita mais precocemente permanecendo positiva por até 34 meses pós-infecção, mesmo na ausência de sinais clínicos (HARRUS et al., 1998), e o DNA da *E. canis* não persiste após o tratamento, sua eliminação, portanto, não produz falso-positivos como na sorologia (WEN et al., 1997). O esfregaço sanguíneo, por sua vez, apresenta boa sensibilidade durante a fase aguda da infecção, mas vale mencionar que falso-positivos podem ocorrer uma vez que mórulas podem ser confundidas com demais alterações morfológicas ou artefato. Por outro lado, a proporção de células infectadas em um animal com erliquiose é menor que 1% (COWELL et al. 1999) e a ausência do parasita no esfregaço não exclui o diagnóstico positivo (EWING, 1969). Neste estudo, os animais utilizados eram oriundos da rotina ambulatorial e, portanto, impossível de se determinar exatamente a fase de infecção.

Acredita-se que os quatro animais positivos simultaneamente na RIFI e esfregaço sanguíneo representem estágio da infecção em que o parasita continua circulante no sangue e já houve tempo suficiente para ativação do sistema imune e produção de anticorpos IgG contra ele, visto que anticorpos IgM e IgG só são detectáveis 1-3 semanas após infecção (McBRIDE et al., 1996). Quanto aos animais positivos apenas no esfregaço sanguíneo e negativos na RIFI (n=14), pode-se inferir tratar-se de uma infecção recente, sem que tenha havido tempo suficiente para a produção de anticorpos ou que o tratamento com antibiótico tenha interrompido a resposta com anticorpos (DAWSON et al., 1996). E deve-se considerar também que as inclusões observadas podem tratar-se de outro parasita ou achado que não *Ehrlichia*. Já os animais negativos no esfregaço sanguíneo e positivos na RIFI (n=53) provavelmente apresentaram contato anterior com o agente e produção de IgG, sem que o agente ainda esteja presente no sangue. Deve-se considerar ainda possibilidade de reação cruzada a outros agentes Anaplasmataceae que não *Ehrlichia* sp. (ORTUÑO et al., 2005), principalmente, entre a *E. canis* e *E. chaffeensis* (WANER et al., 2001).

Doze animais foram positivos para *Ehrlichia* sp. pela RIFI e nested-PCR simultaneamente, sugerindo serem animais com infecção crônica. Por outro lado, animais positivos para nested-PCR, porém negativos na RIFI podem estar associados à infecção recente, sem tempo hábil para a produção de anticorpos IgG ou à amplificação de genes de outros organismos próximos a *Ehrlichia* sp., mas distintos o suficiente para não induzir resposta imune cruzada (EBERHARDT et al., 2006). Outra explicação é que a co-infecção entre patógenos pode cegar o sistema imune em alguns animais (MURPHY et al., 1998). Resultado semelhante foi reportado por Breitschwerdt et al. (2002) que detectaram DNA de *E.*

canis em três felinos domésticos com sinais clínicos de erliquiose, porém soronegativos na RIFI. Já os animais positivos na RIFI e negativos na nested-PCR representam infecção anterior onde o agente esteve presente permitindo a produção de anticorpos IgG. Também existe a possibilidade de cepas de diferentes localidades apresentarem variação antigênica e do tamanho da proteína entre os isolados de *Ehrlichia* sp. ser distinto (CHEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998). Vale ressaltar também a possibilidade de sequestro do parasita por células do sistema fagocítico mononuclear ou por macrófagos esplênicos evadindo da resposta imune do hospedeiro (HARRUS et al., 1998), levando a falso-negativos na nested-PCR e na RIFI. Nakaghi (2004) também pôde concluir que muitos cães negativos à nested-PCR estariam em fase crônica da erliquiose, alojando o parasita no baço, medula óssea, linfonodos e outros tecidos. É conveniente ressaltar que felinos possuem baixa parasitemia e menor número de cópias de DNA de *E. canis* que os cães (EBERHARDT et al., 2006; LAPPIN et al., 2004; LURIA et al., 2004). Braga (2010), em estudo com felinos domésticos, também constatou diferenças entre os métodos de diagnóstico, onde observou 19 animais com inclusões no esfregaço e destes apenas seis foram soropositivos frente à RIFI e apenas um foi positivo na PCR. Porém, após sequenciamento, observou-se que era *E. chaffeensis* e a única amostra positiva na nested-PCR para *E. canis* foi negativa à RIFI e detecção pelo esfregaço. Também Ayllón et al. (2009) estudando gatos da Espanha observaram anticorpos anti-*E. canis* em 3,8% (2/52) dos animais, porém não houve positivos pela PCR ou pela cultura das amostras de sangue nas células DH82 para *E. canis*.

A despeito dos animais positivos na nested-PCR e esfregaço sanguíneo (n=7), pode-se inferir que representam infecção ativa com parasitemia elevada o suficiente para a observação de mórulas sugestivas de Anaplasmataceae no esfregaço sanguíneo, bem como positividade na nested-PCR, técnica de diagnóstico direta mais sensível e específica. Ramos et al. (2009), em estudo para comparação da nested-PCR com o diagnóstico direto pelo esfregaço sanguíneo na detecção de *E. canis* em cães com suspeita clínica de hemoparasitose, observou que dentre os 100 animais estudados, nove foram positivos na detecção direta e 57 na nested-PCR, reforçando a maior sensibilidade da técnica molecular em comparação à detecção pelo esfregaço.

Os três animais positivos simultaneamente para as três técnicas de diagnóstico utilizadas neste estudo, sejam técnicas de detecção direta ou indireta, provavelmente são felinos domésticos com infecção corrente, apresentando parasitemia alta para a observação de inclusões no esfregaço e cuja infecção ocorreu a algum tempo, o bastante para que o sistema imune produzisse anticorpos IgG.

Do total de felinos domésticos avaliados pelo esfregaço sanguíneo, RIFI e pela nested-PCR, 91 (42,1%) gatos apresentaram-se positivos a pelo menos um teste de diagnóstico, representando possível infecção de *Ehrlichia* sp. ou exposição prévia ao agente, enquanto 125 (57,9%) foram negativos simultaneamente aos três testes. Também foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos pela RIFI, técnica considerada padrão ouro para diagnóstico de *Ehrlichia* sp., com a detecção por esfregaço sanguíneo e a nested-PCR. Os resultados demonstraram uma diferença na frequência de positivos entre as técnicas, fato este que está de acordo com o descrito na literatura em função das particularidades de cada técnica, conforme discutido anteriormente. Com isso, sugere-se a associação de técnicas de diagnóstico, em especial uma técnica de detecção direta aliada a uma técnica indireta para melhor caracterização da erliquiose felina. Neste contexto, a associação da RIFI para avaliar a exposição do hospedeiro ao parasita e a nested-PCR para detectar a presença de infecção ativa torna-se uma excelente alternativa para o diagnóstico da erliquiose felina. Diversos autores, como Harrus et al. (1998), Iqbal et al. (1994), Nakaghi (2004) e Wen et al. (1997) também

sugerem tal associação de técnicas para um diagnóstico confiável e preciso da erliquiose, seja em cães ou gatos.

A análise dos valores médios do hemograma dos animais positivos para *Ehrlichia* sp. em pelo menos uma técnica utilizada (n=91) demonstrou que apenas as médias de neutrófilos segmentados demonstraram diferença significativa, onde os animais positivos apresentaram valores médios inferiores aos negativos, mas ainda dentro do valor de referência. No entanto, os felinos negativos apresentaram valores médios acima do valor de referência. Os demais parâmetros do hemograma completo não diferiram entre si a 5% de significância. É digno de nota que o fato dos animais negativos apresentarem valores médios de neutrófilos acima do valor de referência sugere que outras patologias podem estar acometendo estes animais. E considerando-se que as amostras deste estudo foram provenientes do atendimento de clínicas veterinárias, tal sugestão torna-se coerente uma vez que a neutrofilia pode estar associada a diversos processos inflamatórios (STOCKHAM; SCOTT, 2012).

Os achados hematológicos mais frequentes nos 91 animais positivos para *Ehrlichia* sp. em pelo menos uma das técnicas empregadas no presente estudo foram: trombocitopenia (n=46), leucocitose (n=31), neutrofilia (n=28), DER (n=53), anemia (n=16) e hiperproteinemia (n=50). Anemia e trombocitopenia são achados comuns na erliquiose felina e canina (ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY; MASSARD, 1999; DAGNONE et al., 2003; STUBS et al., 2000; SHAW et al., 2001; BREITSCHWERDT et al., 2002). A trombocitopenia ocorre 10 a 20 dias pós-infecção e permanece presente em todas as fases da erliquiose (CASTRO et al., 2004; HARRUS et al., 1996; TROY; FORRESTER, 1990 e WANER et al., 2001). Anticorpos anti-plaquetas vem sendo observados na erliquiose e são responsabilizados pela patogênese da trombocitopenia (HARRUS et al., 1996). A leucocitose, causada pelo aumento da contagem de neutrófilos bastões e segmentados observados no presente estudo, também foi relatada por outros autores em infecção natural em cães (NAKAGHI, 2004 e TROY; FORRESTER, 1990). Este aumento de celularidade pode ser explicado pela moderada hiperplasia da série granulocítica na medula óssea com alterações mielodisplásicas da granulocitopoiese, como observado entre a segunda e terceira semanas de infecção experimental em cães (SILVA, 2001; WOODY; HOSKINS, 1991). A anemia e a pancitopenia acontecem na erliquiose quando a medula óssea é severamente acometida e, portanto, hipoplásica (TROY; FORRESTER, 1990). A anemia normocítica normocrômica, observada mais frequentemente no presente estudo, é a mais comum na erliquiose natural e experimental e pode ser observada a partir da primeira semana pós-infecção (CASTRO et al., 2004; GREIG; ARMSTRONG, 2006; ORIÁ et al., 2001; SILVA, 2001). A anemia pode ocorrer devido ao sequestro de hemácias pelo sistema fagocítico (STILLES, 2000; SILVA, 2001), hemólise extravascular ou presença de anticorpos anti-hemáceas (GILBERT et al., 1992). Outra possibilidade é que pode ocorrer uma supressão da hematopoese decorrente do aumento na produção de citocinas pelos neutrófilos infectados (GREIG; ARMSTRONG, 2006). Também foram observadas alterações na arquitetura da medula óssea provocada pela *E. canis*, com irregularidades na distribuição do tecido hematopoiético e presença de microeritroblastos (SILVA, 2001).

A hiperproteinemia evidenciada nos animais positivos para *Ehrlichia* sp. no presente estudo corrobora com o reportado por Harrus et al. (1996) avaliando as alterações das proteínas séricas em cães naturalmente infectados por *E. canis*. Estes autores observaram hiperproteinemia nos cães infectados, onde as gamaglobulinas deram maior contribuição para este achado, visto que a concentração de gamaglobulina aumenta durante a fase febril da erliquiose e persiste durante as fases subclínica e crônica (RISTIC; HOLLAND, 1993). Também pode estar relacionada à um aumento policlonal nas gamaglobulinas envolvendo

estimulação imune crônica (HARRUS et al., 1996). De modo semelhante, Almosny et al. (1998), Almosny e Massard (1999) e Asgarali et al. (2012) também observaram hiperproteinemia na erliquiose. Hipergamaglobulinemia foi relatada em diversos casos de erliquiose (ALMOSNY, 1998; EWING; PHILIP, 1966; EWING et al., 1971; HARRUS et al., 1996; HARRUS et al., 1997b; NEER, 1998; NEITZ; THOMAS, 1938; WOODY; HOSKINS, 1991).

É importante ressaltar novamente que os animais pertencentes ao presente estudo são provenientes de atendimento em clínicas veterinárias; logo, os achados hematológicos observados nos animais positivos e negativos podem ser causados por outras patologias que não a erliquiose. Neste contexto, a realização de infecção experimental com condições controladas permitiria a melhor caracterização da patogênese da erliquiose, sem interferência de outras patologias (CASTRO et al., 2004). E os parâmetros hematológicos e bioquímicos poderiam ser monitorados e melhor avaliados durante a evolução da doença. Porém, com a criação dos comitês de ética, esta prática tem ocorrido cada vez menos. Adicionalmente, o hemograma completo é uma ferramenta importante na clínica de cães e gatos, fornecendo informações a respeito do estado geral do paciente baseadas em dados obtidos no eritrograma, leucograma e trombograma. A interpretação destes parâmetros auxilia na compreensão sobre as possíveis disfunções apresentadas pelo paciente, mas muitas vezes, não permite fechar um diagnóstico conclusivo.

Vale ressaltar que apesar de haver na literatura, especialmente em cães, uma descrição dos sinais clínicos característicos da erliquiose, bem como dos achados hematológicos e bioquímicos, modificações antigênicas, moleculares e morfológicas nas amostras encontradas no Brasil poderiam levar a diferentes sintomatologias e parâmetros hemato-bioquímicos quando comparado aos descritos em outros países e até mesmo em diferentes regiões do país (DAGNONE, 2006). Os fatores que aparentemente afetam o grau de virulência da infecção, bem como o seu progresso, incluem variações de cepas, espécie, raça, idade, estado imunológico e a presença ou não de outras doenças concomitantes (WOODY; HOSKINS, 1991; NEER, 1998). Assim, o diagnóstico da enfermidade utilizando técnicas diretas e indiretas torna-se fundamental, especialmente em felinos domésticos, onde até o presente momento há poucos estudos. Aliado a isso, cresce a importância da caracterização antigênica e utilização de antígenos produzidos a partir de amostras brasileiras nos testes sorológicos.

Anaplasma platys é um hemoparasita exclusivo de plaquetas e, por isso, evidencia-se uma trombocitopenia cíclica característica na infecção por este agente, que acontece devido à parasitemias cíclicas que ocorrem de oito a 15 dias e tendem a diminuir com a cronicização da doença. Recentemente houve a primeira detecção molecular em felinos domésticos no Brasil (LIMA et al., 2010), confirmando sua circulação nesta espécie e reforçando a necessidade de maiores estudos do agente na população de gatos e da ampliação do uso de técnicas moleculares na detecção deste hemoparasito.

Avaliando a positividade para *A. platys*, 7,9% (n=17) do total de animais amostrados no presente estudo apresentaram inclusões sugestivas em plaquetas no esfregaço sanguíneo, 3,7% (n=8) foram positivos pela qPCR e apenas 0,9% (n=2) animais foram positivos nas duas técnicas simultaneamente. Acredita-se que estes dois animais, positivos em ambas as técnicas de detecção direta, representem efetivamente infecção por *A. platys*, com parasitemia elevada o suficiente para a visualização de inclusões intraplaquetárias sugestivas de *A. platys* no esfregaço sanguíneo. Vale mencionar que esta técnica de detecção direta, apesar de ser pouco custosa, consome muito tempo e normalmente não é compensadora já que as mórulas normalmente estão ausentes ou em número muito baixo (BRADFIELD et al., 1996; HARRUS et al., 1997; MARTIN et al., 2005), motivo pelo qual as demais amostras positivas pela qPCR

não apresentaram inclusões no esfregaço. Aliado a isto, está o fato de que outros patógenos e estruturas podem estar presentes em plaquetas além de *A. platys*, como descrito anteriormente, gerando falso-positivos na detecção direta por esfregaço sanguíneo.

Os resultados do presente estudo corroboram com Correa et al. (2011) que observaram 9,89% (9/91) de mórulas em plaquetas de gatos do Norte Fluminense, sendo que as inclusões foram observadas em menos de 1% das plaquetas e 13,18% (12/91) de felinos positivos na nested-PCR para *A. platys*. Neste mesmo estudo, apenas quatro animais que apresentaram mórulas em macroplaquetas no esfregaço sanguíneo também foram positivos para a nested-PCR. Lima et al. (2010), utilizando a nested-PCR, fez a primeira descrição de *A. platys* em um gato, o qual apresentava mórulas em plaquetas e sinais clínicos da enfermidade. Também Martin et al. (2005), após encontrar 10 cães positivos na nested-PCR, observou que no esfregaço sanguíneo desses animais não mais de 1% das plaquetas estavam parasitadas, realçando as limitações das técnicas e as possibilidades de outros diagnósticos que não *A. platys*.

Ao avaliar os resultados médios do hemograma completo dos animais positivos para *A. platys*, seja pelo esfregaço sanguíneo ou qPCR (n=23), foi observado que a média de linfócitos dos animais positivos foi superior à dos negativos, mas dentro do valor de referência. E, avaliando somente os gatos positivos na qPCR, observou-se aumento das médias de linfócitos, dos neutrófilos bastões e eosinófilos dos animais positivo em relação aos negativos, apresentando-se acima do valor de referência. Stockham e Scott (2012) sugerem que processos inflamatórios crônicos, especialmente devido às infecções bacterianas causadas por anaplasmas, determinam linfocitose em função do aumento da linfopoese em resposta a estimulação crônica por antígeno ou citocinas. A linfocitose é normalmente discreta ou moderada e anormalidades concomitantes no leucograma comumente incluem uma neutrofilia, tal como observado no presente estudo. É digno de nota, no entanto, que os animais utilizados no presente estudo foram originários de clínicas veterinárias e diversos fatores podem também estar atuando. Também Souza (2006) observou que cães infectados por *A. platys* apresentaram eosinofilia em comparação aos demais cães testados. Consequentemente, existe uma variação do leucograma nos quadros clínicos de erliquiose e anaplasose, que se altera de acordo com a fase da doença (SOUZA, 2006).

As alterações hematológicas mais frequentemente observadas nos animais positivos para *A. platys* (n=23) foram: trombocitopenia (n=12), leucocitose (n=9); neutrofilia (n=7), desvio à esquerda regenerativo (n=16) e anemia (n=3). A maioria dos animais infectados por *A. platys* é assintomática, porém diversos autores citam anemia e trombocitopenia como alterações hematológicas que podem ser observadas em gatos com Rickettsioses (AGUIRRE et al., 2004; ALMOSNY, 1998; ALMOSNY; MASSARD 1999; LITTLE et al., 2010; STUBBS et al., 2000). Em estudos com cães justifica-se a trombocitopenia, achado mais grave e frequente na infecção por *A. platys*, devido à diminuição da sobrevivência das plaquetas devido à intensa proliferação do agente, ou por resposta imunomediada ou por agregação plaquetária (GAUNT et al., 1990; STILES, 2000; WOODY e HOSKINS, 1991). As diferenças de sinais clínicos nos animais com *A. platys* podem estar ligadas à raça do animal, às diferenças individuais na resposta imune, à carga infectante, ou ainda à patogenicidade de cepas (WILSON, 1992; CHANG et al., 1996). A anemia normocítica normocrômica que ocorre durante a fase cíclica se assemelha à descrita na anemia da doença inflamatória, sendo a inflamação e a resposta imune do hospedeiro ao agente as causas desta e de outras alterações relacionadas à anaplasose (BAKER et al., 1987).

Os resultados do presente estudo foram similares ao reportado por Correa et al. (2011), que observaram como alterações mais frequentes anemia, leucocitose e trombocitopenia e

também não evidenciaram relação estatística ($p>0,05$) com a doença. Também observou que as médias de neutrófilos para os grupos de animais positivos e negativos, nos grupos de detecção por esfregaço e pela nested-PCR permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie felina, porém o intervalo de confiança destas médias foi estatisticamente diferente ao nível de 5% de probabilidade, semelhante ao observado no presente estudo. Também Santarém et al. (2005) observaram anemia normocítica normocrômica, linfopenia, leucocitose com desvio à esquerda e trombocitopenia em uma gata com inclusões sugestivas de *A. platys*, porém não puderam associar diretamente à anaplasnose. É digno de nota que, na literatura consultada, existem poucos estudos sobre alterações hematológicas envolvendo infecção por *A. platys*, principalmente em felinos domésticos.

Vale ressaltar que o hemograma é uma ferramenta complementar, muito utilizado para a avaliação do estado geral do animal e orientação clínica do médico veterinário, devendo ser avaliado juntamente com o exame clínico e o histórico do animal. Assim, os achados hematológicos do presente estudo não devem ser associados exclusivamente aos hemoparasitas estudados.

A co-positividade para *E. canis* e *A. platys* também foi avaliada no presente estudo. Os resultados demonstraram que apenas um animal apresentou-se positivo simultaneamente na qPCR para *A. platys* e na sorologia para *Ehrlichia sp.*. Com isso, não se pode afirmar uma co-infecção atual, ainda porque a RIFI só detecta anticorpos após certo tempo de exposição ao agente e agentes Anaplasmataceae podem dividir antígenos em comum. Além disso, este animal foi negativo na nested-PCR para *E. canis*, o que nos permite inferir uma infecção anterior por *E. canis* ou presença de antígenos de *A. platys* que reagiram na RIFI. A co-infecção por *E. canis* e *A. platys* tem sido relatada no Brasil (RAMOS et al., 2009; SANTOS et al., 2009) e no mundo, como China (HUA et al., 2000), Caribe (YABSLEY et al., 2005) e Venezuela (SUksAWAT et al., 2001), porém não há relatos de sua ocorrência em felinos domésticos.

Avaliando os dados de sexo, raça e idade em associação com os resultados de positividade para *Ehrlichia sp.*, observou-se que filhotes apresentaram menor positividade pela RIFI, em relação aos adultos e idosos. Este resultado sugere que o animal, por ser ainda jovem, apresenta pouco tempo de contato com possíveis vetores em comparação com os animais mais velhos (BANETH et al., 1998), e assim ainda não desenvolveu anticorpos contra a doença, como ocorre na fase aguda da infecção (SHAW et al., 2001). Tais achados corroboram com o relatado por Tanikawa et al. (2013) e Asgarali et al. (2012) em cães naturalmente infectados por *E. canis*. Já na nested-PCR, animais jovens foram mais acometidos, demonstrando que esta técnica pode ser mais útil na detecção da infecção ativa e fase aguda da doença, principalmente nesta faixa etária que ainda não possui uma imunidade bem desenvolvida. Os parâmetros raça e sexo não apresentaram diferença entre as categorias nas diferentes técnicas utilizadas.

O perfil de gatos com erliquiose não foi definido ainda, porém para cães, Munhoz et al. (2003), observando a ocorrência da erliquiose canina nos cães atendidos no Hospital Veterinário da Unesp/Jaboticabal entre 1990 e 2001, demonstrou que o perfil dos animais com diagnóstico clínico de erliquiose era, na maioria, machos, sem raça definida (SRD), e com idade variando de 0 a 5 anos, sendo a anorexia, anemia e trombocitopenia os achados mais frequentes. Existem relatos contraditórios de diferenças em idade e gênero agindo na soropositividade para *E. canis*. Asgarali et al. (2012) reportaram aumento significativo na soropositividade pela RIFI em cães com mais de um ano de idade, já que a probabilidade de infecção aumenta com o passar do tempo. Também Rodriguez-Vivas et al. (2005) observaram aumento da infecção por *E. canis* em cães com mais de dois anos. Outros autores também

observaram associação entre idade e infecção (LABARTHE et al., 2003; WANER et al., 2001). Alguns autores citam que a positividade independe do gênero (ASGARALI et al., 2012; BANETH et al., 1996 e RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005), enquanto outros autores relatam maior frequência em machos do que em fêmeas (BATMAZ et al., 2001). Porém acredita-se que ambos os gêneros tem oportunidade de exposição ao vetor (ASGARALI et al., 2012).

Avaliando sequenciamento de nucleotídeos e caracterização molecular, apenas duas amostras positivas pela nested-PCR para *Ehrlichia* sp. foram submetidas ao sequenciamento do fragmento de 358pb para o gene 16S *rRNA*. Os resultados demonstraram que uma sequência apresentou 100% de similaridade com isolados de *Ehrlichia* sp. e *E. canis* (JN121380), enquanto a outra demonstrou 99% de similaridade com isolados de *Ehrlichia* sp. *ocelot* (ANDRÉ et al., 2012) e *Ehrlichia* sp. *little-spotted-cat* (ANDRÉ et al., 2012).

Estes resultados confirmam a presença de *E. canis* na população de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro e também demonstram a presença de uma espécie recente, até então encontrada apenas em felinos selvagens. Com isso, se reforça a necessidade do sequenciamento após amplificação pela PCR, para uma correta identificação das espécies presentes na população estudada.

Não foi observada diferença significativa entre a positividade nas diferentes técnicas utilizadas para diagnóstico de *E. canis* e *A. platys* e a região de origem dos animais (baixada fluminense e Rio de Janeiro). Assim, infere-se que os fatores presentes nestas regiões, como clima, condições sanitárias em que os animais são criados, área urbana ou área suburbana, comportamento da população, distribuição de possíveis vetores, dentre outros, não influenciaram na positividade para estes agentes infecciosos nos felinos do presente estudo. Sabe-se que a prevalência da infecção de *E. canis* em cães do sudeste variam de 15% (MACIEIRA et al., 2005) a 44,7% (COSTA JR et al., 2007). De modo semelhante, a ocorrência de *E. canis* em diferentes localizações geográficas variam de acordo com o tipo de população estudada, total de animais avaliados em cada estudo e método de diagnóstico utilizado. Este mesmo princípio pode ser extrapolado para estudos envolvendo infecção por *A. platys*, tanto em felinos como em outros animais domésticos, sugerindo-se mais estudos abordando um maior número de animais e com presença de possíveis fatores associados à infecção destes animais.

Em relação à transmissão destes agentes aos felinos, provavelmente devido aos hábitos de higiene destes animais, talvez ocorra remoção dos possíveis vetores sem que haja transmissão dos hemoparasitas, que ocorre com 24 a 48 horas após a fixação do carrapato; também há possibilidade que os felinos sejam mais resistentes a infecções ou menos expostos a vetores em relação aos cães (EBERHARDT et al., 2006; LAPPIN et al., 2004). Apesar de Oliveira et al. (2009) sugerir o carrapato *R. sanguineus* como vetor da erliquiose felina no Brasil, devido a sua ampla distribuição no país, os mecanismos de transmissão permanecem pouco esclarecidos (SHAW, 2001; BRAGA et al., 2012). E mesmo havendo relatos de que carrapatos contendo mórulas compatíveis com *Ehrlichia/Anaplasma* spp. foram encontrados em gatos (TARELLO, 2005), existem evidências da infecção destes agentes sem exposição à artrópodes (CHARPENTIER et al., 1986; BEAUFILS et al., 1999; BOULOY et al., 1994). Também há associação da transmissão por pulgas (PEAVY et al., 1997) e pela ingestão de roedores infectados (KORDICK et al., 1995) ou pelo contato com artrópodes que se alimentam de roedores (KAWHARA et al., 1993; NICHOLSON et al., 1998). Consequentemente, tornam-se necessários maiores estudos para definir os vetores e os mecanismos de transmissão dos agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos.

O conhecimento relacionado com a distribuição geográfica, achados patológicos e potencial zoonótico das infecções por agentes Anaplasmataceae tem se expandido nos últimos anos. A identificação das espécies que acometem os animais domésticos, em especial os felinos domésticos, é importante para a elaboração de medidas de controle dessa doença, seja nos animais ou nos seres humanos, devido ao estreito convívio entre estes. A associação de técnicas de diagnóstico na identificação deve ser adotada para melhor caracterização da infecção por estes agentes.

6 CONCLUSÕES

- Felinos domésticos da região Metropolitana do Rio de Janeiro são expostos a espécies de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma platys*;
- A detecção direta pela microscopia óptica de inclusões citoplasmáticas em leucócitos e plaquetas pode auxiliar na suspeita do diagnóstico de infecções agudas causadas por agentes da Família Anaplasmataceae, porém devido aos possíveis diagnósticos diferenciais, a identificação morfológica desses agentes deve ser realizada com atenção e por pessoal devidamente treinado, associada à PCR para um diagnóstico conclusivo e definitivo;
- A RIFI é um teste qualitativamente eficiente na detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia* sp., caracterizando principalmente contato com o agente, porém para um diagnóstico mais efetivo deve ser associado à PCR;
- O sequenciamento do fragmento da PCR amplificado, baseada no gene 16S rRNA, confirmou pela primeira vez a detecção de *Ehrlichia canis* em gatos domésticos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro;
- A PCR, associada ao sequenciamento, permitiu a confirmação de *Anaplasma platys* nas amostras de felinos domésticos obtidas no presente estudo;
- *Anaplasma phagocytophilum* não está presente na população estudada, porém estudos abrangendo outros genes deverão ser executados;
- Alterações hematológicas podem ser uma importante ferramenta para os clínicos veterinários de pequenos animais no diagnóstico de agentes Anaplasmataceae, quando os exames sorológicos e as técnicas moleculares não estão disponíveis.

7 BIBLIOGRAFIA

AGUERO-ROSENFELD, M.E. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: State of the art. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.2, n.4, p.233–239, 2002.

AGUERO-ROSENFELD, M.E., HOROWITZ, H.W., WORMSER, G.P., MCKENNA, D.F., NOWAKOWSKI, J., MUNOZ, J., DUMLER, J.S. Human Granulocytic Ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. **Ann. Intern. Med.** v.125, p.904–908. 1996.

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Animal biodiversity and emerging diseases: Comparison between different polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.118-120, 2008.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Assessment of feline ehrlichiosis in Central Spain using serology and a polimerase chain reaction technique. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1026, p.103-105, 2004.

ALMOSNY, N.R.P.; ALMEIDA, L.E; MOREIRA, N.M.; MASSARD, C.L. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.5, n.2, p.82-83, 1998.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose felina – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.4, n.23, p.30-32, 1999.

ALVES L.M., LINHARES G.F.C., CHAVES N.S.T., MONTEIRO L.C. & LINHARES D.C. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciênc. Anim. Bras.** v.6, p.49-54. 2005.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina - Revisão. **Clínica Veterinária**. A. IV, n.19, p.31-38, 1999.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; SILVA, K.F.; NAKAGHI, A.C.H. Molecular and Sorologic Detection of *Ehrlichia* spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v.46, n.3, p.1017-1023, 2010.

ANDRÉ, M.R.; DUMLER, J.S.; SCORPIO, D.G.; TEIXEIRA, R.H.F.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Tick and Tick-borne Diseases**. v.3, p.247-253, 2012.

ARRAGA, A.C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. Fine structural characterization of a rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. **J. Med. Microbiol.**, v.48, p. 991-997, 1999.

ASGARALI, Z.; PARGASS, I.; ADAM, J.; MUTANI, A.; EZEOKOLI, C. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.3, p.207-211, 2012.

AYLLÓN, T.; VILLA ESCUSA, A.; TESOURO, M.Á.; SAINZ, Á. Serology, PCR and culture of *Ehrlichia/Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, CMI 15, (Suppl2), p.4-5, 2009.

AYRES, M. **BioEstat 2.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2000. 272 p.

BAKER, D. C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Veterinary Pathology**, v.24, n. 5, p. 449-53, 1987.

BAKKEN, J.S., KRUEH, J., WILSON-NORDSKOG, C., TILDEN, R.L., ASANOVICH, K., DUMLER, J.S. Clinical and laboratory characteristics of Human Granulocytic Ehrlichiosis. **JAMA**, v.275, p.199–205. 1996.

BAKKEN, J.S.; DUMLER, S. Human granulocytic anaplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.22, n.12, p.443-448, 2008.

BANETH, G.; AROCH, I.; TAL, N.; HARRUS, S. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v.79, p.123-133, 1998.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**. v.138, p.257-259, 1996.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, p.271–274, 1996.

BATMAZ, H., NEVO, E., WANER, T., SENTURK, S., YILMAZ, Z., HARRUS, S., Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. **Vet. Rec.** v.148, p.665–666, 2001.

BEALL, M.J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M.D.; CYR, K.E.; DINIZ, P.P.; MAINVILLE, C.; HEGARTY, B.C.; CRAWFORD, J.M. BREITSCHWERDT, E.B. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.4, p.455-464, 2008.

- BEAUFILS, J. P.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.; BARBAULT-JUMELLE, M. Ehrlichiose probable chez le chat: etude retrospective sur 21 cas. **Pratique Médecine Chir Animal Compagnie**, n.34, p.587-596, 1999.
- BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, n.1, p.17-20, 2002.
- BILLETER S.A, Spencer J.A., Griffin B., Dykstra C.C., Blagburn B.L. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. **Vet. Parasitol.** V.147(1/2) p.194-198. 2007.
- BJÖERSDORFF, A.; SVENDENIUS, L.; OWENS, J.H.; MASSUNG, R.F. Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.40, n.1, p.20-24, 1999.
- BOULOY, R.P.; LAPPIN, M.R.; HOLLAND, C.H.; THRALL, M.A.; BAKER, D.; O' NEIL, S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.204, n.9, p.1475-1478, 1994.
- BRADFIELD, J.F.; VORE, S.J.; PRYOR, Jr., W.H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. **Laboratory Animal Science**, v.46, n.5, p.565-568, 1996.
- BRAGA, M.S.C.O.; ANDRÉ, M.R.; FRESCHI, C.R.; TEIXEIRA, M.C.A.; MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. In cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.1, p.37-41, 2012.
- BRAGA, M.S.C.O.; **Diagnóstico molecular de hemoparasitas e frequência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii e anti-Neospora caninum, em gatos peridomiciliados na cidade de São Luis, Maranhão.** 2010. 90f. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.
- BREITSCHWERDT, E.B.; ANTHONY, C.G.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; LAPPIN, M.R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S.I.; COWAN, S.M.; CLOOTEN, J.K.; HEGARTY, B.C.; HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.16, n.6, p.642-649, 2002.
- BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2645-2651, 1998b.
- CADMAN, H.F.; KELLY, P.J.; MATTHEWMAN, L.A.; ZHOU, R.; MASON, P.R. Comparison of the dot-blot enzyme-linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v.135, n.15, p.362, 1994.
- CALIC, S.B.; BARCELLO-ROCHA, C.M.; LEITE, R.C.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A.M. Old and new human rickettsiosis in Minas Gerais State, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1063, p.356-357, 2005.

CASPERSEN, K.; PARK, J-H.; PATIL, S.; DUMLER, J.S. Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophila msp2* (p44). **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.3, p.1230-1234, 2002.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; TOMAZ DE AQUINO, L.P.C.; ALESSI, A.C.; TINUSSI COSTA, M. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.119, n.1, p.73-86, 2004.

CHANG, A.C.; CHANG, W.L.; LIN, C.T.; PAN, M.J.; LEE, S.C. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.58, n.5, p.473-476, 1996.

CHANG, C.C., CHOMEL, B.B., KASTEN, R.W., ROMANO, V., TIETZE, N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.1221-1226, 2001.

CHANG, W.L.; PAN, M.J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.3142-3146, 1996.

CHARPENTIER, F.; GROULADE, P. Probable case of Ehrlichiosis in a cat. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France**. v.3, n.59, p.287-90, 1986.

CHEN, S.-M., YU, X.-J., POPOV, V.L., WESTERMAN, E.L., HAMILTON, F.G., WALKER, D.H., Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: Comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. **J. Infect. Dis.** v.175, p.856-863, 1997.

COHN L.A. Ehrlichiosis and related infections. *Vet. Clin. North Am.*, **Small Anim. Pract.** v. 33, n.4, p.863-84, 2003

CORREA, E.S., PALUDO G.R., SCALON M.C., MACHADO J.A., LIMA A.C.Q., PINTO A.T.B., THIEBAUT J.T.L. & ALBERNAZ A.P. Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: Alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.10, p.899-909, 2011.

COSTA Jr, L.M.C. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**. v.174, n.3, p.673-676, 2007.

COSTA, P.S.G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATT, M.E.; GRECO, D.B. More About Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, n.1, p.7-10, 2006

COURTNEY, J.W.; KOSTELNIK, L.M.; NORDIN, S.Z.; MASSUNG, R.F. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3164-3168, 2004.

COWEL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1999. 338 p.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.285-290, 2003.

DAGNONE, A.S.; **Caracterização molecular de espécies da Família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS**. 2006. 118f. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.191-201, 2001.

DAHROUG M.A.A; **Diagnóstico molecular de parasitoses em felídeos silvestres**. 2009. 47f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Mato Grosso, Campo Grande, MS. 2009.

DAWSON, J. E.; CANDAL, F. J.; GEORGE, V. G.; ADES, E. W. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. **Pathobiology**. v.61, n.5-6, p.293-296, 1993.

DAWSON, J.E.; WARNER, C.K.; STANDAERT, S.; OLSON, J.G. The Interface Between Research and the Diagnosis of an Emerging Tick-borne Disease, Human Ehrlichiosis Due to *Ehrlichia chaffeensis*. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.156, p.137-142, 1996.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existente in Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique**, v.28, p.418-419, 1935.

DORAN, T.I.; PARMLEY, R.T.; LOGAS, P.C.; CHAMBLIN, S. Infection with *Ehrlichia canis* in a child. **Journal of Pediatrics**, v.114, n.5, p.809-812, 1989.

DRAZENOVICH, N.; FOLEY, J.; BROWN, R. Use of Real-Time Quantitative PCR Targeting the *msp2* Protein Gene to Identify Cryptic *Anaplasma phagocytophilum* Infections in Wildlife and Domestic Animals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v.6, n.1, p.83-90, 2006.

DUMLER, J.S.; CHOI, K.S.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BARAT, N.S.; SCORPIO, D.G.; GARYU, J.W.; GRAB, D.J.; BAKKEN, J.S. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases** v.11, p.1828–1834, 2005.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S.C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R., Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE

agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.2145–2165. 2001.

DUMLER, J.S.; BARAT, N.C.; BARAT, C.E.; BAKKEN, J.S. Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, n.2, p.199-204, 2007.

DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, Suppl. 1, p.S45–S51, 2007.

EBERHARDT, J.M.; NEAL, K.; SHACKELFORD, T.; LAPPIN, M.R. Prevalence of infectious disease agents in cats from Arizona. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, n.3, p.164-168, 2006.

ESKOW, E., RAO, R.V., MORDECHAI, E., Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. **Arch. Neurol.** v.58, p.1357–1363. 2001.

EWING, B., HILLIER, L; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, New York, v.8, n.3, p.175-1985, 1998.

EWING, S.A. Canine ehrlichiosis. **Advances in Veterinary, Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.13, p.331-353, 1969.

EWING, S.A.; PHILIP, C.B. *Ehrlichia*-Like Rickettsiosis in dogs in Oklahoma and its relations to *Neorickettsia helminthoeca*. **American Journal of Veterinary Research.** v.27, n.116, p.67-69, 1966.

EWING, S.A.; ROBERSON, W.R.; BUCKNER, P.G.; HAYAT, C.S. A new Strain of *Ehrlichia canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.159, n.12, p.1771-1774, 1971

FISHBEIN, D.B.; SAWYER, L.A.; HOLLAND, C.J.; HAYES, E.B.; OKOROANYANWU, W.; WILLIAMS, D.; SIKES, R.K.; RISTIC, M.; McDADE, J.E. Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks: infection with an *Ehrlichia*? **Journal of American Medical Association**, v.257, n.22, p.3100-3104, 1987.

FOGGIE, A. Studies on tick-borne fever. **Journal of General Microbiology.** III: Proceedings, v–vi. 1949.

FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; MADIGAN, J.E. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.10, p.1599-1605, 2001.

GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 290-293, 1990.

- GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelets aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. **American Journal of Veterinary Research**. v.51 n.2, p.290-293 1990.
- GOLDEN, S.E.; SPRINGFIELD, M.O. Aseptic meningitis associated with *Ehrlichia canis* infection. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**. v.8, n.5, p.335-337, 1989.
- GOLDMAN, E.E.; BREITSCHWERDT, E.B.; GRINDEM, C.B.; HEGARTY, B.C.; WALLS, J.J.; DUMLER, J.S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.12, n.2, p.61-70, 1998.
- GREENE, C.E. **Infectious diseases of The Dog and Cat**. St. Louis: Saunders, 2006. Cap. 28, 1387p.
- GREENE, C.E.; HARVEY, J.W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB. Saunders Company, p.405-414, 1990.
- GREIG, B.; ARMSTRONG, P. J. Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3ed. St. Louis, Mo: Saunders, p.219-224. 2006.
- GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.36, n.1, p.937-940, 1975.
- GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J.M.; BALDANI, C.D. *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em felinos domésticos: análise sorológica e molecular. In: **VII Fórum da Pós-graduação da Universidade Federal rural do Rio de Janeiro**. 2012, Seropédica, RJ.
- HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview **The Veterinary Journal** v.187, p.292–296, 2011.
- HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**. v.66, p.241–249, 1996.
- HARRUS, S.; WANER, T.; FREIDMAN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z.; BARK, H.; HARMELIN, A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary immunology and Immunopathology**. v.96, n.3-4, p.239-243, 2003.
- HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, S.M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v.86, n.4, p.361-368, 2002.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestation of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v.141, n.10, p.247-250, 1997a.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.19, n.4, p.431-444, 1997b.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J.E.; POLAND, A.M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.1, p.73-76, 1998.

HARVEY, J.W. *Ehrlichia platys* infection (Infectious Cyclic Thrombocytopenia of Dogs) In. GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, cap.37 p.415-418. 1990.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J.Infec.Dis.**, v.137, p.182-188, 1978.

HEIKKILA, H.M.; BONDARENKO, A.; MIHALKOV, A.; PFISTER, K.; SPILLMANN, T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in domestic cat in Finland: case report. **ActaVeterinaria**, p.52-62, 2010.

HELMET, I.E. et al. Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocytes cultures. **Cornell Vet**, v.70, p.37-42, 1980.

HIBLER, S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **The Compendium On Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.8 n.2 p.106-114, 1986.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, v.16, n.3, p.13-21, 1991.

HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.44, n.9, p.737-739, 2000.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; FERGUSON, J. A.; WALKER, J. S. Ehrlichia canis - the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs? **Veterinary Record**, v.85, n.21, p.587, 1969.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; WALKER, T.S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.157, n.11, p.1627-1632, 1970.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. www.sidra.ibge.gov.br- consultado em 20/01/2013

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

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, 1993, 417p.

JOHNSON, E.M.; EWING, S.A.; BARKER, R.W.; FOX, J.C.; CROW, D.W.; KOCAN, K.M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.74, n. 2-4, p.277-288, 1998.

KAKOMA, I.; SÁINZ, A.; TESOURO, M.; AMUSATEGUI, I.; KIM, C.H.; BIGGERSTAFF, J.; McPEAK, J.; LEVY, M.G. Standardization of the diagnostic criteria for Canine Ehrlichiosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916 p.396-403. 2000.

KAWAHARA, M. et al. *Ehrlichia chaffeensis* Sick Deer, Nara Park, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.12, p.1991-1993, 2009.

KEYSARY, A. et al. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.13, p.521-523, 2001.

KORDICK, D., LAPPIN, M. & BREITSCHWERDT, E. Feline rickettsial diseases, In: J. Bonagura J. (Ed.), **Kirk's Current Veterinary Therapy**. XII. W.B. Saunders, Philadelphia. p.287-290, 1995.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LAI, T.H.; KUMAGAI, Y.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; RIKIHISA, Y. *The Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. **Journal Bacteriology**. v.191, n.3, p.693-700, 2009.

LAPPIN, M. R. Feline ehrlichiosis and hemobartonellosis. In: **World Small Animal Veterinary Association World Congress**. Anais.Vancouver, 2001.

LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A.; DUNNIGAN, B.; RHA, J.; WILLIAMS, C.R.; BREWER, M.; FALL, M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats of North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, n.6, p.893-896, 2004.

LEE, F.S.; CHU, F.K.; TACKLEY, M.; WU, A.D.; ATRI, A.; WESSELS, M.R. Human granulocytic ehrlichiosis presenting as facial diplegia in a 42-year-old woman. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, n.5, p.1288-1291, 2000.

- LEPIDI, H.; BUNNELL, J.E.; MARTIN, M.E. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, n.1, p.29-37, 2000.
- LIMA, M.L.F.; SOARES, P.T.; RAMOS, C.A.N.; ARAÚJO, F.R.; RAMOS, R.A.N.; SOUZA, I.I.F.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.381-385, 2010.
- LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Vet.Clin.Small Anim.** v.40, p.1121-1141, 2010.
- LURIA B.J., Levy J.K., Lappin M.R., Breitschwerdt E.B., Legendre A.M., Hernandez J.A., Gorman S.P. & Lee I.T. 2004. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **J. Feline Med. Surg.** v.6, n.5, p.287-96.
- MACHADO, R.Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.13, p.53-57, 2004.
- MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; SOUZA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JUNIOR, J.R.F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.8, p.705-708, 2012.
- MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA A.D.E.M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.34, p.44-48, 2005
- MADEWELL, B.R.; GRIBBLE, D.H. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.80, n.5, p.512-514, 1982.
- MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R.C.; RISTIC, M.; COX, D.; MCDADE, J.E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **The New England Journal of Medicine**, v.316, n.14, p.853-856, 1987.
- MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; HAVENGA, L.N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors**. v.6, p.103, 2013.
- MAGNARELLI, L.A., DUMLER, J.S., ANDERSON, J.F., JOHNSON, R.C., FIKRIG, E., Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.3054-3057. 1995.
- MARCONDES, C.B. Generalidades e Importância das Doenças Relacionadas com Artrópodes. In: MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**, p.1-3, 2009.

MARSILIO, F.; DI MARTINO, B.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (*gltA*) gene from various Italian strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.215–217, 2006.

MARTIN A.R., BROWN, G.K., DUNSTAN, R.H., ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v.109, p.176-180, 2005.

MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, S.D.; GAUNT, S.D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8 p.441-447. 1996.

MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.; WALKER, D.H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v.71, p.2516–2524, 2003.

MCDADE, J.E. Ehrlichiosis – A disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 609-617. April 1990.

MITCHELL, P.D., REED, K.D., HOFKES, J.M., Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and Human Granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.724–727. 1996.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Série – Biologia molecular. Atualização Parte 2 – Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v.2, n.2, p.139-142, 2004.

MOTT, J. & RIKIHISA, Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. **Infection and Immunity**, v.68, n.12, p.6697-6703, 2000.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n.4, p.325-339, 1998.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. ANDRADE, G.M. Detecção molecular de *Ehrlichia canis* pela “nested” PCR e avaliação de sua sensibilidade no diagnóstico da erliquiose canina. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v.13, n.1, p.356, 2004.

NAKAGHI, A.C.H; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, v.38, n.3, 2008.

NEER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis In: GREENE, C.E. Infectious diseases of The Dog and Cat, **Hepatozoonosis**. St. Louis: Saunders, Cap. 28, p.203-216, 2006.

NEER, T. M. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, cap.28, p.139-154. 1998.

NEITZ, W. O; THOMAS, A. D. Rickettsiosis in the dog. **Journal of the South African Veterinary Medicine Association**, v.9, n.4, p.166-174, 1938.

NICHOLSON W.L., MUIR S., SUMNER J.W. & CHILDS J.E. Serologic evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in wild rodents (Muridae: Sigmodontinae) in the United States. **J. Clin. Microbiol.** v.36, n.3, p.695-700, 1998.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

OLIVEIRA, L.S.; MOURÃO, L.C.; OLIVEIRA, K.A.; DA MATTA AGOSTINI, M.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE ALMEIDA, M.R.; FIETTO, J.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; FILHO, J.D.; GALVÃO, M.A.; MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, Supl.2, p.53-54, 2009.

OLSEN, G.J; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.7, p.113–123, 1993.

ORÍÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-Blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis***. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP, 2001

ORTUÑO, A.; GAUSS, C.B.L.; GARCIA, F.; GUTIERREZ, J.F. Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from Northeastern Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.52, n.5, p.246-248, 2005.

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

PEAVY, G.M.; HOLLAND, C.J.; SUKANTA, K.D.; SMITH, G.; MOORE, A.; RICH, L.J.; LAPPIN, M.R.; RITCHTER, K. Suspected ehrlichial infection in five cats from a household. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.210, n.2, p.231-234, 1997

PEREIRA, A.M. **Detecção sorológica, molecular e análise filogenética de membros da Família Anaplasmataceae em cães naturalmente infectados no Rio de Janeiro**. 131f. Tese (doutorado) Universidade Federal Fluminense, 2012.

- PEREZ, M. et al. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1078, n.1, p.110-117, 2006.
- PETROVEC, M., FURLAN, S.L., ZUPANC, T.A., STRLE, F., BROUQUI, P., ROUX, V., DUMLER, J.S., Human disease in Europe caused by a Granulocytic *Ehrlichia* species. **J.Clin.Microbiol.** v.35, p.1556–1559. 1997.
- PLIER, M.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; KIDD, L.B. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.45, n.5, p.232-238, 2009.
- POITOUT, F.M.; SHINOZAKI, J.K.; STOCKWELL, P.J.; HOLLAND, C.J.; SHUKLA, S.K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.796-801, 2005.
- POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; FENG, H.M.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R.B.; WALKER, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, n.3, p.235-251, 1998.
- Preziosi D.E.; Cohn L.A. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.** v. 24 p.277-291. 2002.
- PUSTERLA, N.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; LUTZ, H. Serological evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.4, p.1168-9, 1999.
- RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES JR., D.S.; SOUZA, I.I.F.; ONO, T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.O.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, supl.1, p.58-62, 2009.
- REDDY, G.R.; STRECK, C.P. Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent *Ehrlichia chaffeensis* suggests that it plays a role in immune evasion. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v.1, n.3, p.167-175, 1999.
- REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n.2, p.68-74, 2004.
- RIKIHISA, Y. The Tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.3, p.286-308, 1991.
- RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, p.704-709, 1984.

RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Canine ehrlichiosis. In: Z. Woldehiwet and M. Ristic (Editors), **Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals**. Pergamon, Oxford, p.169-186, 1993.

Rodriguez-Vivas, R.I., Albornoz, R.E., Bolio, G.M., *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Vet. Parasitol.** v.127, p.75-79. 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTARÉM, V.A.; LAPOSY, C.V.; FARIAS, M.R. Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Colloquium Agrariae**, v.1, n.2, p.60-66, 2005.

SANTOS, A.S.; ALEXANDRE, N.; SOUSA, R.; NÚNCIO, M.S.; BACELLAR, F.; DUMLER, J.S. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tick borne disease in Portugal. **Veterinary Record**, v.164, p.168-171, 2009.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. First report of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from Brazil detected by real-time PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, p.770-774, 2011.

SCHALM, O. W. **Veterinary hematology**. 6ª edição, Wiley-Blackwell, 2010.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, KIdlington, v.3, n.4, p.193-209, 2001

SILVA, V.L.D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológico e histopatológico da medula óssea, na erliquiose canina aguda: estudo experimental**. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; HEGARTY, B.; ESPADA, Y.; LLULL, J.; BREITSCHWERDT, E. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod borne organisms in cats from northeastern Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.118, n.3-4, p.274-277, 2006.

SOUSA, V.R.F.; **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***. 2006. 46f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

STEERE, A.C.; BARTENHAGEN, N.H.; CRAFT, J.E.; HUTCHINSON, G.J.; NEWMAN, J.H.; RAHN, D.W.; SIGAL, L.H.; SPIELER, P.N.; STENN, K.S.; MALAWISTA, S.E.; The early clinical manifestations of Lyme disease. **Ann. Intern. Med.** v.99, p.76-82. 1983.

STEPHENSON, E.H.; OSTERMAN, J.V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.11, p.1815-1819, 1977.

STILES, J. Canine rickettsial infectious. **Vet.Clin.Nort.Am. Sm. An. Prac.**, v.30, p.1135-1150, 2000.

STUBBS, C.J.; HOLLAND, C.J.; REIF, J.S.; WHEELER, S.; BRUNS, C.; LAPPIN, M.R. Feline ehrlichiosis. **The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarians**, Princeton, v.22, n.4, p.307-318, 2000.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C. Coinfection with Three *Ehrlichia* Species in Dogs from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA Secondary Structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.90-93, 2001.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In. ETTINGER, S.J. (Ed.): **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2v. v.1, cap.46, p.277-281, 1989.

TABAR M.D., Altet L., Francino O., Sanchez A. & Ferrer L. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). **Vet. Parasitol.** v.151. n.2/4, p.332-336. 2008.

TABAR, M.D.; ALTET, L.; FRANCININO, O.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.151, n.2-4, p.332-336, 2007.

TARELLO, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. **Veterinary Record**, v.156, n.24, p.772-774, 2005.

TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.404-418, 1990.

VINASCO J., LI O., ALVARADO A., DIAZ D., HOYOS L., TABACHI L., SIRIGIREDDY K., FERGUSON C.; MORO M.H. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. **J. Clin. Microbiol.** v.45, p.2716-2719, 2007.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, n.1, p.18-29, 1996.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v.95, n.1, p.1-15, 2001.

WANG, T.; MALAWISTA, S.E.; PAL, U.; GREY, M.; MEEK, J.; AKKOYUNLU, M.; THOMAS, V.; FIKRIG, E. Superoxide anion production during *Anaplasma*

phagocytophila infection. **The Journal of Infection Diseases**, v.186, n.2, p.274-280, 2002.

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

WILSON, J. F. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.28, n.4, p. 381-383, 1992.

WITWER, C.T.; REED, G.H.; GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; PRYOR, R.J.; High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v.49, p.853–860, 2003.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.21, n.1, p.75-98, 1991.

YABSLEY, M.J.; DAVIDSON, W.R.; STALLKNECHT, D.E.; VARELA, A.S.; SWIFT, P.KDEVOS, J.C. JR.; DUBAY, S.A. Evidence of tick-borne organisms in mule deer (*Odocoileus hemionus*) from the western United States. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v.5, n.4, p.351-362, 2005.

YIN-CHIACHUN; LIU-HUNGJEN; LIN-SUENCHUAIN; LIAO-MINGHUEI; WUYEONGHUEY. Identification of *Ehrlichia canis* in cats by nested polymerase chain reaction and nucleotide sequence analysis. **Taiwan Veterinary Journal**, Taipei, v.29, n.2, p.122-128, 2003.

YU, J.; PRESSOIR, G.; BRIGGS, W.H.; VROH, B.I.I.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY J.F.; MCMULLEN, M.D.; GAUT, B.S.; NIELSEN D.M.; HOLLAND J.B. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nat Genet**, v.38, p.203–208, 2006