

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

TESE

Diagnóstico molecular de *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) em cães domésticos e carrapatos de áreas urbanas e rurais na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Huarrisson Azevedo Santos

2011



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

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Anaplasma phagocytophilum*
(FOGGIE, 1949) EM CÃES DOMÉSTICOS E CARRAPATOS DE
ÁREAS URBANAS E RURAIS NA MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ,
RIO DE JANEIRO**

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

e Co-Orientação dos Professores
**Cristiane Divan Baldani e
Sandra Maria Gomes Thomé**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Abril de 2011

595.42098153

S237d

T

Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-

Diagnóstico molecular de *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) em cães domésticos e carrapatos de áreas urbanas e rurais na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro / Huarrisson Azevedo Santos - 2011.
76 f. : il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 52-69.


1. Carrapato como transmissor de doenças - Itaguaí (RJ) - Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. 3. Anaplasma - Teses. 4. Cão - Doenças - Itaguaí (RJ) - Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

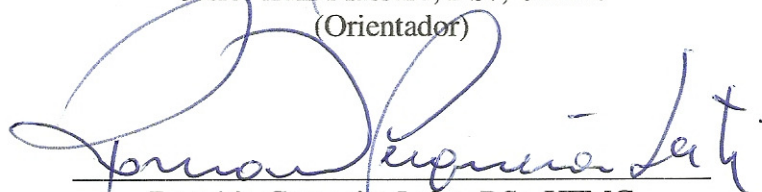
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

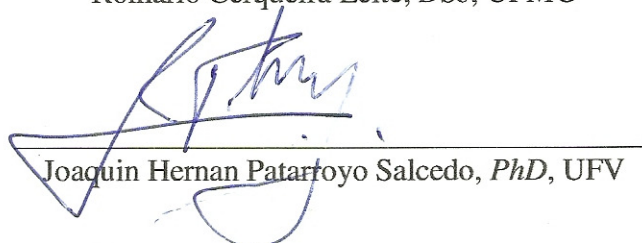
TESE APROVADA EM 11/04/2011




Carlos Luiz Massard, *DSc*, UFRRJ
(Orientador)



Romário Cerqueira Leite, *DSc*, UFMG



Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo, *PhD*, UFV



Rosângela Zacarias Machado, *PhD*, UNESP



Nádia Regina Pereira Almosny, *DSc*, UFF

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra

À Deus, que me proporcionou a vida;
Aos meus pais, Gerside Abreu Azevedo Santos e Sebastião Oliveira Santos;
Aos meus irmãos, Leandro Azevedo Santos e Eileen Azevedo Santos;
A minha esposa, Isabele da Costa Angelo;
Ao meu filho, Pedro Angelo Santos;
A meu professor e amigo, Carlos Luiz Massard.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado e Doutorado em Ciências Veterinária.

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de estudo, que foi essencial nesta jornada.

Ao meu Professor orientador Dr. Carlos Luiz Massard, pela ajuda, apoio, amizade, incentivos e confiança durante toda a minha vida acadêmica.

Aos meus pais Gerside Abreu Azevedo Santos e Sebastião Oliveira Santos pelo apoio incondicional, amor e compreensão.

A minha querida e amada esposa a Dr^a Isabele da Costa Angelo e ao meu lindo filho Pedro Angelo Santos pelo carinho e apoio durante todo o meu percurso na pós-graduação.

A minha querida irmã Eileen Azevedo Santos pelos conselhos sempre muito valiosos.

Ao Professor Dr. João Luiz Horacio Faccini pela orientação durante a elaboração dos manuscritos para publicação e também pela ajuda científica durante todo o curso.

Ao Professor e querido irmão Leandro Azevedo Santos pela valiosa orientação na realização das reações de PCR em tempo real.

Aos Professores Dr.^a Cristiane Divan Baldani e Sandra Maria Gomes Thomé pela co-orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Emérito Hugo Edison Barbosa de Rezende e ao professor titular, Dr. Willhelm Otto Daniel Martin Neitz “in memoriam” por idealizarem e estruturarem os laboratórios para pesquisa parasitológica (E.E.P.P.W.O.Neitz do DPA/IV/UFRRJ), pelo que representam para pesquisa biológica em parasitologia veterinária no Brasil, nos últimos 37 anos.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos conhecimentos transmitidos, fundamentais para minha formação profissional e pessoal.

Aos meus familiares, sempre confiantes no meu retorno promissor.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz pela excelente convivência e apoio.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório Tiago Marques dos Santos, Marcus Sandes Pires, Érica Cristina Rocha Roier, Usha Vashist, Maristela Peixoto, Joice Aparecida Rezende Vilela, Cláudia Bezerra da Silva, Aline Falqueto Duarte, Larissa Moraes, Juliana Raimundo e Andressa Guimarães por todo ânimo, alegria, incentivo, ajuda e principalmente pela ótima convivência de trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído para este trabalho.

BIOGRAFIA

Huarrisson Azevedo Santos, filho de Sebastião Oliveira Santos e Gerside Abreu Azevedo Santos, natural de Bom Jesus da Lapa, BA, nascido em 18 de março de 1980. Realizou o segundo grau completo na Escola Agrotécnica Federal de Januária, Minas Gerais, concluído em 1997. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Medicina Veterinária em 2002 obtendo o segundo lugar na classificação geral de sua turma, concluindo o curso em março de 2007. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) e durante os três últimos anos da graduação iniciou seus estudos com *A. (P.) miniatus*.

É membro participante de vários projetos de pesquisa desenvolvidos junto ao laboratório de Hemoparasitos e Vetores do DPA/IV/UFRRJ e atualmente faz parte do grupo de pesquisa/CNPq Hemoparasitos de Importância Veterinária, liderado pelo seu orientador, Carlos Luiz Massard, desde 2002.

Em março de 2007, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias em nível de mestrado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, inicialmente como bolsista de mestrado do CNPq e a partir de março de 2008 como bolsista nota 10 da FAPERJ. Na Pós-graduação obteve sempre conceitos máximos em mais de 30 créditos cursados, dentre as disciplinas concluídas.

Em março de 2009 ingressou no mesmo curso de Pós-graduação em nível de doutorado sendo contemplado com bolsa concedida pela CAPES.

Em Maio de 2009 foi aprovado em concurso público para o cargo de professor substituto do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública onde ministrou aulas nas disciplinas de Doenças Parasitárias, Higiene e Saúde Pública e Epidemiologia Aplicada.

Em fevereiro de 2010 foi aprovado em concurso público para o cargo de técnico em biologia molecular na UFRRJ sendo lotado no laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária.

Desde de 2007 participa das atividades laboratoriais e auxilia na elaboração de projetos de pesquisa com carrapatos e hemoparasitos, biologia de vetores, leciona aulas práticas e teóricas das disciplinas de Hemoprotozoários de Importância Veterinária e Agentes Patogênicos Transmitidos por Artrópodes sob a orientação do professor titular Dr. Carlos Luiz Massard. Auxilia também nas aulas práticas da disciplina Doenças Parasitárias, DESP/IV/UFRRJ, lecionando temas relacionados a hemoparasitos e parasitoses. Tem participado de Congressos Nacionais e Internacionais relacionados à Parasitologia Veterinária.

Em relação à publicação de artigos técnicos e científicos destacam-se os seguintes: 1- participação nos trabalhos de erradicação e controle de carrapatos realizados no complexo esportivo de Deodoro-RJ, durante os jogos Pan-americanos Rio-2007; 4- artigos relacionados com os aspectos da biologia do carrapato *A. (P.) miniatus*; 2- artigos relacionados com as Babesioses equinas; 2- artigos relacionados com biologia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em hospedeiros alternativos; 1-artigo relacionado a infecção de cães por *Anaplasma phagocytophilum* tema de sua tese de doutorado.

RESUMO

SANTOS, Huarrisson Azevedo. **Diagnóstico molecular de *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) em cães domésticos e carrapatos de áreas urbanas e rurais na microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro**, 2011. 76p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Anaplasma phagocytophilum é um patógeno emergente capaz de infectar humanos, equinos e cães em todo o mundo. Essa bactéria é transmitida por carrapatos ixodídeos e mantida na natureza por uma variedade de pequenos mamíferos silvestres. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença do DNA de *A. phagocytophilum* em cães e carrapatos da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, além de estabelecer os fatores associados (idade, sexo, raça, infestação por carrapatos, etc) e as possíveis alterações hematológicas com a infecção por *A. phagocytophilum* em cães desta região. Essa bactéria foi detectada pela primeira vez no Brasil, em cães e carrapatos de áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, RJ através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Dos 398 cães amostrados, 24 (6,03%) foram considerados positivos, com limite de detecção (C_T) variando entre 26 a 35 ciclos. As amostras positivas clonadas em pGEM-T apresentaram 100% de identidade com outras sequências de *A. phagocytophilum* depositadas no GenBank. Utilizando números definidos de cópias do plasmídeo contendo um inserto de 122pb do gene *msp2* a sensibilidade analítica do ensaio de PCR em tempo real através do sistema SYBR green foi capaz de detectar até três cópias do plasmídeo. O ensaio foi considerado específico quando DNA de bactérias proximamente relacionadas à *A. phagocytophilum* foi colocado na reação. Um fragmento de 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum* foi detectado através da TaqMan-PCR em um carrapato fêmea da espécie *Amblyomma cajennense* e em cinco *Rhipicephalus sanguineus*, sendo quatro machos e uma fêmea. As amostras de carrapatos positivas obtiveram C_T que variaram entre 26,75 e 33,14 ciclos. A técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan foi capaz de detectar uma única cópia do gene *msp2* de *A. phagocytophilum* em amostras de DNA de carrapatos. Infestação por carrapatos foram observadas em 66,67% (n=16) dos cães positivos na PCR. As espécies de carrapatos identificadas nos cães positivos foram *R. sanguineus* e *A. cajennense*, com predominância desta última espécie de carrapato. O histórico de infestação por carrapatos, acesso a áreas de mata e condição de limpeza do ambiente foram os fatores que apresentaram associação com a presença do DNA de *A. phagocytophilum* em cães na região estudada. Os principais achados hematológicos em cães infectados com *A. phagocytophilum* foram trombocitopenia, linfopenia e aumento do volume plaquetário médio. Os resultados do presente estudo demonstram que o agente da Anaplasmoose Granulocítica Canina circula na região estudada e os cães podem servir como fonte de infecção para carrapatos vetores do agente. Este é o primeiro relato de *A. phagocytophilum* no Brasil, um agente zoonótico emergente responsável pela Anaplasmoose Granulocítica Humana.

Palavras-chave: *Anaplasma phagocytophilum*, Cães, PCR em Tempo Real, Hematologia, Epidemiologia.

ABSTRACT

SANTOS, Huarrisson Azevedo. **Molecular diagnostic of *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in domestic dogs and ticks of urban and rural areas from Itaguaí microregion, Rio de Janeiro state**, 2011. 76p. Tese (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Anaplasma phagocytophilum is an emerging pathogen of humans, horses, and dogs worldwide that is transmitted by Ixodid ticks and maintained in a variety of small wild mammal species. The objective of the present study was to evaluate the presence of *A. phagocytophilum* DNA in dogs and ticks of Itaguaí microregion, Rio de Janeiro, as well as establish the associated factors (age, gender, breed, tick infestation, etc) and possible hematological alterations with *A. phagocytophilum* infection in dogs. *Anaplasma phagocytophilum* was detected for the first time from Brazil, in dogs the ticks of urban the rural areas in the Itaguaí microregion, Rio de Janeiro state, by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Of 398 samples, 24 (6.03%) were positive, with a C_T ranging from 26 to 35 cycles. Amplicons from one positive sample were cloned in the pGEM-T and sequenced. The sequence obtained demonstrated 100% identity with other *A. phagocytophilum* sequences published in the GenBank database. The analytical sensitivity of RT-PCR using SYBR green system was able to detect three plasmid copies when defined numbers of plasmid copies containing 122 base pairs from the *msp2* gene were used. The assay was considered specific when DNA from bacteria closely related to *A. phagocytophilum* was placed in the reaction. A fragment of 122pb *msp2* gene of *A. phagocytophilum* was detected by TaqMan-PCR in one female tick of *Amblyomma cajennense* and in five *Rhipicephalus sanguineus*, being four males and one female. Positive tick samples obtained C_T that ranged from 26.75 to 33.14 cycles. The TaqMan-PCR assay was capable to detect a single copy of *A. phagocytophilum msp2* gene in DNA tick sample. Tick infestation was observed in 66.67% (n = 16) of PCR positive dogs. The tick species identified in positive dogs were *R. sanguineus* and *A. cajennense*, with predominance of the latter tick species. The history of tick infestation, access to forest areas and environment condition of cleanliness were factors associated with *A. phagocytophilum* infection in dogs. The main hematologic findings in dogs infected with *A. phagocytophilum* were thrombocytopenia, lymphopenia and increased mean platelet volume. These results demonstrate that the canine granulocytic anaplasmosis agent is present in regions in which dogs could be a source of infection for tick vectors. This is the first report of *A. phagocytophilum* in Brazil, a emergent zoonotic agent responsible of Human Granulocytic Anaplasmosis.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, dogs, real-time PCR, Hematology, Epidemiology.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Frequência de cães positivos na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em função do sexo, raça, idade, tamanho do pêlo, porte do animal, escore corporal, histórico de infestações anteriores, histórico de doenças causadas por agentes transmitidos por carrapato e histórico de epistaxe, rinorragia etc.....	27
TABELA 2	Frequência de cães positivos na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em função das características inerentes ao comportamento do cão e características do domicílio.....	31
TABELA 3	Características das residências ou propriedade rurais localizadas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, em função do resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	33
TABELA 4	Eritrograma e sólidos totais de cães positivos na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	35
TABELA 5	Leucograma de cães positivos na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	38
TABELA 6.	Frequência de hemoparasitos diagnóstico através da técnica de esfregaço sanguíneo em cães, naturalmente infectados, domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ.....	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Localização geográfica da microrregião de Itaguaí e os municípios de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro.....	16
FIGURA 2	Curva de dissociação (<i>Melting Curve</i>) do fragmento de 122pb do gene <i>msp2</i> do controle positivo e das amostras de cães positivas mostrando a especificidade de amplificação de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> pela PCR em tempo real.....	22
FIGURA 3	Curva padrão criada a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o fragmento de 122 pares de base do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> . O valor de C_T obtido pela PCR em tempo real foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo utilizando o sistema SYBR green.....	23
FIGURA 4	Sensibilidade analítica da PCR em tempo real mostrando a curva de amplificação de diluições seriadas (3 – 3.000.000 cópias) do DNA plasmidial contendo o fragmento de 122 pares de base do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	24
FIGURA 5	Curva de amplificação do fragmento de 122 pares de base do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em carrapatos das espécies <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Amblyomma cajennense</i> obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema Taqman. As linhas vermelhas representam os controles positivos e as linhas azuis as amostras de carrapatos positivas.....	25
FIGURA 6	Curva padrão criada a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o fragmento de 122 pares de base do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> . O valor de C_T obtido pela TaqMan-PCR foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo.....	26
FIGURA 7	Sensibilidade analítica da Taqman-PCR. A curva mostra amplificação de diluições seriadas (1 – 100.000 cópias) do DNA plasmidial contendo o fragmento de 122 pares de base do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolado de carrapatos.....	26
FIGURA 8	Ectoparasitismo em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. 8A. Percentual de cães infestados por ectoparasitas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. 8B. Fauna ixodológica em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	29
FIGURA 9	Percentual de cães positivos para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> na PCR	

	em tempo real em função da espécie de carrapato encontrada parasitando os cães.....	29
FIGURA 10	Nível de infestação por carrapatos em função da positividade na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. Grau de infestação baixo (<cinco carrapatos), moderado (\geq cinco<15 carrapatos), alto (\geq 15<30 carrapatos) e muito alto (\geq 30 carrapatos).....	30
FIGURA 11	Frequência de cães parasitados em por carrapatos <i>Amblyomma</i> sp e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	31
FIGURA 12	Frequência de cães com alterações no volume globular, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina plasmática e número de plaquetas em função do resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	36
FIGURA 13	Frequência de cães com alterações nos índices hematimétricos (hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, amplitude de distribuição das hemácias e volume plaquetário médio) em função do resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	37
FIGURA 14	Frequência de cães com alterações na leucometria global, número absoluto de linfócitos, monócitos e granulócitos em função do resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	39
FIGURA 15	Gametócitos de <i>Hepatozoon canis</i> em neutrófilos visualizado em esfregaço sanguíneo, através de microscopia ótica, de cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí-RJ (1000X).....	41
FIGURA 16	Trofozoítos de <i>Babesia canis</i> infectando hemácias visualizados em esfregaço sanguíneo, através de microscopia ótica em cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ (1000X).....	41
FIGURA 17	Corpúsculo de inclusão de <i>Anaplasma platys</i> em plaquetas, visualizado em esfregaço sanguíneo, em cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ (1000X).....	42
FIGURA 18	<i>Ehrlichia canis</i> em monócitos (A) e <i>Dirofilaria immitis</i> (B) visualizados em esfregaço sanguíneo, em cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ (1000X).....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Breve Histórico.....	03
2.2 Posição Taxonômica.....	04
2.3 Ecologia e Epidemiologia.....	04
2.3.1 Vetores.....	04
2.3.2 Diversidade de Hospedeiros e Reservatórios.....	04
2.3.3 Outras formas de transmissão de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	05
2.3.4 Distribuição e Soroprevalência da Anaplasmoze Granulocítica Canina.....	06
2.3.5 Variação Genética de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	07
2.3.6 Fatores de Risco para a Infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em Cães.....	07
2.4 Patogenia de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	08
2.5 Alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10
2.6 Resposta Imune contra <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	11
2.7 Manifestações Clínicas em Cães infectados com <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	11
2.8 Diagnóstico da Anaplasmoze Granulocítica Canina	13
2.9 Anaplasmoze Granulocítica Humana e Sua Importância para Saúde Pública.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Descrição da região estudada.....	16
3.2 Tamanho da amostra e amostragem.....	16
3.3 Questionários.....	17
3.4 Obtenção das amostras de sangue e carrapatos.....	17
3.5 Extração de DNA de amostras de capa leucocitária e carrapatos.....	17
3.6 Quantificação e pureza das amostras de DNA.....	18
3.7 Obtenção dos controles positivos.....	18
3.8 PCR em tempo real das amostras de DNA de cão.....	18
3.9 PCR em tempo real das amostras de DNA de carrapato.....	19
3.10 Cuidados para Evitar contaminações.....	19
3.11 Clonagem e Sequenciamento.....	19
3.12 Sensibilidade e Especificidade analítica da PCR utilizando SYBR Green para detecção da amplificação de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em amostras de capa leucocitária em cães.....	20
3.13 Sensibilidade e Especificidade analítica da TaqMan-PCR para o diagnóstico de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em carrapatos.....	20
3.14 Avaliação Hematológica.....	20
3.15 Avaliação parasitológica por esfregaço sanguíneo.....	21
3.16 Análise Estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em amostras de capa leucocitária obtidas de cães.....	22
4.2 PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em carrapatos obtidos de cães.....	24
4.3 Fatores associados com o resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Anaplasma</i>	

<i>phagocytophilum</i>	26
4.3.1 Fatores associados às características do cão com a infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	27
4.3.2 Fatores associados ao ectoparasitismo em cães com a infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	28
4.3.3 Fatores associados ao comportamento e o hábito do cão com a infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	31
4.3.4 Características das propriedades visitadas e sua associação com a presença de cães positivos para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	32
4.4 Análise hematológica.....	34
4.5 Avaliação hemoparasitológica por esfregaço sanguíneo.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
5.1 PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	43
5.2 PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em carrapatos obtidos de cães	45
5.3 Fatores associados com o resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	46
5.3.1 Fatores associados às características do cão e do domicílio com a infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	46
5.3.2 Fatores associados ao ectoparasitismo em cães com a infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	48
5.4 Análise hematológica.....	49
5.4 Avaliação hemoparasitológica por esfregaço sanguíneo.....	50
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. ANEXOS.....	70
8.1 ANEXO A. Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	71
8.2 ANEXO B. Protocolo de extração de DNA de Carrapato.....	74
8.3 ANEXO C. Protocolo de extração de DNA a partir de cultivo células fixadas fixado em lâminas preparadas para Imunofluorescência com auxílio do kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).....	76

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma phagocytophilum (Foggie, 1949) Dumler et al., 2001 é uma bactéria intracitoplasmática obrigatória, pertence à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. A espécie *A. phagocytophilum* infecta granulócitos, predominantemente neutrófilos, onde se reproduz formando pequenas colônias chamadas mórulas. Esta bactéria infecta o homem, cães, equinos, gatos, ruminantes, lhamas, além de uma grande variedade de pequenos mamíferos silvestres (BARLOUGH et al., 1997a; BJOERSDORFF et al., 1999; LOTRIE-PUSTERLA et al., 2000; WEBER et al., 2000; FURLAN et al., 2001; REMY et al., 2003). Esta rickettsia é transmitida por espécies de carrapatos que pertencem ao complexo *Ixodes persulcatus*, incluindo *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* nos Estados Unidos, *Ixodes ricinus* na Europa Ocidental e *I. persulcatus* na Europa Oriental e na Ásia (DE LA FUENTE et al., 2004).

A maioria dos cães naturalmente infectados com *A. phagocytophilum* se mantém saudáveis, como indicado por levantamentos sorológicos realizados em áreas endêmicas (FOLEY et al., 2001; BEALL et al., 2008). Os achados clínicos mais comuns encontrados em cães são letargia, inapetência, febre e esplenomegalia (KOHN et al., 2008). A alteração hematológica mais consistente é a trombocitopenia, mas também são observadas anemia leve, linfopenia, monocitose entre outras. O cão pode ser considerado um importante reservatório de *A. phagocytophilum* para humanos, tanto pela diversidade dos sinais clínicos inespecíficos quanto pela proximidade do cão e seus carrapatos com os seres humanos.

O teste de imunofluorescência indireta é comumente usado para o diagnóstico de *A. phagocytophilum* em cães, mas deve-se levar em consideração possíveis co-infecções, a reatividade cruzada entre diferentes patógenos especialmente aqueles pertencentes ao mesmo genótipo (RIKIHISA et al., 1991; KORDICK et al., 1999; DUMLER et al., 2001; SUKSAWAT et al., 2002) e soroconversão (AGUERO-ROSENFELD et al., 2000). A estratégia de diagnóstico tem portanto, focado em métodos moleculares (MASSUNG; SLATER, 2003). Modalidades de PCR convencional e em tempo real têm sido desenvolvidas para a detecção de *A. phagocytophilum* em DNA de sangue periférico, capa leucocitária, medula óssea, ou em amostras de tecido esplênico. Alguns destes testes podem amplificar DNA de outras espécies de rickettsias e o sequenciamento do produto da PCR é necessário para determinar se *A. phagocytophilum* é a espécie infectante. Outras técnicas amplificam apenas o DNA de *A. phagocytophilum*. Os alvos da maioria dos testes utilizados, têm sido os genes 16S rRNA ou o gene da proteína de superfície principal (*msp2*). As técnicas que utilizam o gene *msp2* são normalmente específicas para *A. phagocytophilum*, enquanto que as que utilizam o gene 16S rRNA podem detectar outras espécies de *Anaplasma*, e até mesmo outras espécies de bactérias como *Bartonella henselae* (EGENVALL et al., 2000b).

Diversos aspectos relacionados com o hospedeiro, o ambiente e o agente têm sido incriminados como fatores de risco para a infecção por *A. phagocytophilum* em cães. Entre esses fatores pode se destacar a estação do ano, co-infecções, presença de sinais clínicos e as variantes genéticas do parasito. As infecções por *A. phagocytophilum* são diagnosticadas com maior frequência nos meses que ocorre os picos dos estágios de ninfas e adultos dos carrapatos transmissores. Recentes estudos têm demonstrado uma maior tendência de infecção nos cães mais velhos, refletindo uma maior propabilidade de infestação por carrapatos ao longo do tempo (KOHN et al., 2010).

A diversidade de hospedeiros de *A. phagocytophilum* sugere a presença de diferentes genótipos do parasito (DE LA FUENTE et al., 2005a). Esse aspecto é um fator que pode interferir no diagnóstico molecular desta riquetsia. Assim, primers previamente avaliados como sendo capazes de detectar diferentes genótipos de *A. phagocytophilum* foram utilizados

no presente estudo. Os objetivos do presente trabalho foram: a) desenvolver um PCR em tempo real baseado em SYBR Green para avaliar a ocorrência de *A. phagocytophilum* em cães na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro; b) determinar os fatores associados com a infecção por *A. phagocytophilum* (sexo, idade, raça, porte, escore corporal, histórico de infestação por carrapatos, etc) como também as possíveis alterações hematológicas; c) padronizar um PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan-PCR para investigar a presença de DNA de *A. phagocytophilum* em carrapatos coletados em cães na microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Histórico

O protótipo de *Anaplasma phagocytophilum* que causa a Febre do Carrapato em ovinos e bovinos na Europa foi inicialmente denominado *Rickettsia phagocytophila* (FOGGIE, 1949). Esse agente foi então renomeado como *Cytoecetes phagocytophila* por Foggie (1962) em função da sua predileção por células granulocíticas e também pela similaridade morfológica com *Cytoecetes microti* Tyzzer (1938). Subsequentemente, *C. phagocytophila* foi incluído na tribo Ehrlichieae na ordem Rickettsiales com a denominação de *Ehrlichia phagocytophila* (RISTIC; HUXSOLL, 1984). Até o ano de 2001 esta espécie foi assim denominada, quando Dumler et al. baseando-se na similaridade do gene 16S rRNA reorganizou a ordem rickettsiales agrupando *E. phagocytophila* (agente da febre do carrapato em bovinos, ovinos e caprinos), *E. equi* (agente da ehrlichiose granulocítica equina) e o agente da Ehrlichiose Granulocítica Humana (assim denominado) em uma única espécie, agora denominada de *A. phagocytophilum*.

Anaplasma phagocytophilum foi diagnosticado pela primeira vez como um agente patogênico após a sua identificação no citoplasma de leucócitos de ovinos na Escócia em 1932 (FOGGIE, 1951; WOLDEHIWET, 1983). A doença em animais domésticos na Europa é conhecida como febre do carrapato, e já foi relatada em ovinos, bovinos, caprinos e veados. O relato da anaplasmoose granulocítica em equinos ocorreu em 1968 na Califórnia (MADIGAN; GRIBBLE, 1987). Os primeiros relatos de infecção por *A. phagocytophilum* em cães foi realizado também na Califórnia em 1982 (MADEWELL; GRIBBLE, 1982). Em humanos o primeiro relato ocorreu no Centro-Oeste dos Estados Unidos em 1993 (CHEN et al., 1994), e desde de então, a anaplasmoose granulocítica em diversas espécies animais tem sido frequentemente diagnosticada em diversas partes do mundo.

A Anaplasmoose Granulocítica Canina (AGC) é uma doença que acomete cães cujos alvos primários são os neutrófilos. *A. phagocytophilum*, tal quais as espécies do gênero *Ehrlichia* se caracterizam por serem bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, pleomórficas, que se replicam em vacúolos de células eucarióticas, através de divisão binária, formando grandes corpos de inclusão denominados de mórulas (DUMLER et al., 2001). As mórulas e os vacúolos citoplasmáticos são de tamanhos variáveis, com o último variando entre 1,5 µm e 6 µm de diâmetro (FOGGIE, 1951; POPOV et al., 1998). As bactérias aparecem como estruturas pequenas e densas, enquanto outras são grandes e menos densamente coradas aparecendo como corpos reticulados (TUOMI; VON BONSDORFF, 1966; WOLDEHIWET; SCOTT, 1982). Ambas as formas se dividem por fissão binária e estruturas fantasmas também podem estar presentes (WOLDEHIWET; SCOTT, 1982).

A renomeação de *E. equi*, *E. phagocytophila* e o agente da Anaplasmoose Granulocítica Humana (AGH) como *A. phagocytophilum* baseada na análise da sequência do gene 16S rRNA tem sido controversa, principalmente por que este organismo difere de espécies de *Anaplasma*, tais como, *A. marginale*, por seu tropismo por células do hospedeiro (UILENBERG et al., 2004). Além disso, as renomeadas espécies de *Ehrlichia* diferem em sua virulência em diferentes espécies de hospedeiros, com experimentos de transmissão cruzada mostrando falha de isolados europeus de *E. phagocytophila* em causar doença em equinos, e falha do agente da EGH isolado de humanos nos Estados Unidos em causar doença em bovinos (PUSTERLA et al., 1999b). Estas são consideradas variações fenotípicas entre cepas de *A. phagocytophilum* em diferentes localizações geográficas. À exceção de lhamas, não tem sido relatada a infecção por *A. phagocytophilum* em ruminantes domésticos nos Estados Unidos. Cepas que infectam ruminantes domésticos na Europa e cervídeo da cauda branca nos

Estados Unidos parecem ser distintas daquelas que infectam equinos, humanos e cães com base na análise da sequência do gene que codifica a Proteína de Superfície Principal (MSP).

1.2 Posição Taxonômica

Domínio Eubacteria (Haeckel, 1894) C.R. Woese et al., 1990

Filo proteobacteria Garrity et al., 2005

Classe Alphaproteobacteria Garrity et al., 2006

Ordem Rickettsiales (Gieszczykiewicz, 1939) Dumler et al., 2001

Família Anaplasmataceae (Philip, 1957) Dumler et al., 2001

Gênero *Anaplasma* Theiler, 1910

Espécie *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) Dumler et al., 2001

2.2 Ecologia e Epidemiologia

2.2.1 Vetores

Os principais vetores de *A. phagocytophilum* pertencem ao complexo *Ixodes persulcatus*, incluindo as espécies *I. ricinus* na Europa, *I. persulcatus* no Leste Europeu e Ásia, *I. scapularis* e *I. pacificus* na América do Norte (ALLEMAN; WAMSLEY, 2008). Este agente também já foi identificado em *I. ricinus* e *I. ventralloii* em Portugal e na ilha da Madeira (SANTOS et al., 2009b). Outros carrapatos também têm sido implicados na transmissão, incluindo *Ixodes trianguliceps*, *Ixodes hexagonus* e *R. sanguineus* na Europa (SANTOS et al., 2009b; BROWN et al., 2008; NIJHOF et al., 2007, SATTA et al. 2010).

Macleod e Gordon (1933) e Macleod (1936) executaram uma série de experimentos para estabelecer as formas de transmissão de *A. phagocytophilum* nos carrapatos. Nestes estudos foi verificado que a bactéria é transmitida transestadialmente pelo carrapato *I. ricinus* e que o agente sobrevive no carrapato infectado por mais de um ano, enquanto espera por um novo hospedeiro. A transmissão transovariana não ocorre nas espécies de carrapato do gênero *Ixodes*, então a infecção deve ser adquirida pelos estágios imaturos do carrapato (larva ou ninfa) em um mamífero infectado e transmitir no estágio subsequente, já que o carrapato se alimenta uma única vez em cada estágio do ciclo biológico (MACLEOD, 1936; OGDEN et al., 2002).

A transmissão experimental após a picada de *I. pacificus* e *I. scapularis* tem sido documentada na literatura (RICHTER et al., 1996; TELFORD et al., 1996; PUSTERLA et al., 2002). Em estudos recentes, a exposição a carrapatos foi reportada em 14 de 18 cães com anaplasmose granulocítica na Europa demonstrando uma forte associação da doença com a presença de carrapatos (KOHN et al., 2008).

2.2.2 Diversidade de Hospedeiros e Reservatórios

A diversidade de hospedeiro de *A. phagocytophilum* parece variar de acordo com a região geográfica. A incidência e a severidade da doença em um hospedeiro particular também podem variar de uma região do mundo para outra. Esta variação possivelmente está relacionada com a cepa ou variante de *A. phagocytophilum* de uma espécie particular de reservatório, das espécies de hospedeiros acidentais e também da capacidade de transmissão dos vetores em uma determinada região (TUOMI, 1967; OGDEN et al. 2002; TAGLAS; FOLEY, 2006).

Anaplasma phagocytophilum já foi relatado em caprinos (GRAY et al., 1988). Entre os ruminantes de vida livre no Reino Unido, o parasito foi detectado em cabras selvagens

(*Capra hircus*) por Foster e Greig (1969), em veado vermelho (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) e em corças (*Capreolus capreolus*) (MCDIARMID, 1965; ALBERDI et al., 2000). O microorganismo também foi detectado em uma variedade de cervídeos, incluindo veados, alces (*Alces alces*) e camurça (*Rupicapra rupicapra*) na Noruega (STUEN et al., 2001; JENKINS et al., 2001.), Eslovênia (PETROVEC et al., 2002) na Suíça, (LIZ et al., 2002) e Áustria (POLIN et al., 2004). Variantes da AGH da América do Norte são conhecidas por causar doença clínica em cães e cavalos, mas não em bovinos (PUSTERLA et al., 2001). Porém, em condições naturais, não é conhecido se as variantes da AGH podem causar doença clínica em ruminantes domésticos. Tate et al. (2005) mostraram que veados foram suscetíveis à infecção experimental. Em outro estudo Massung et al. (2006) demonstraram que os caprinos são suscetíveis à infecção experimental com uma variante da AGH (Ap Variant-1). Estes autores sugeriram que a variante de cabras infectadas tinham uma linhagem distinta de outra estirpe, Ap-ha, que infecta humanos, mas foi muito menos virulenta do que as variantes que infectam ruminantes na Europa.

Infecção por *A. phagocytophilum* foi relatada, embora menos comumente, em camelos e gatos domésticos (BARLOUGH et al., 1997a; LAPPIN et al., 2004; TARELLO, 2005; LASCOLA et al., 2009).

Dependendo da localização geográfica, uma variedade de pequenos mamíferos silvestres, incluindo, camundongos, ratos de madeira, esquilos, ratazanas, musaranho, e possivelmente pássaros podem atuar como hospedeiros reservatórios para *A. phagocytophilum*. No Centro-Oeste e Norte dos Estados Unidos ratos da cauda branca (*Peromyscus leucopus*) e no Norte esquilos provavelmente atuam como reservatórios (TELFORD et al., 1996; WALLS et al., 1997), enquanto que nos estados do Sul, ratos de madeira da pata escura e esquilos são os principais reservatórios (FOLEY et al., 2002; NIETO et al., 2008a; FOLEY et al., 2008b; FOLEY et al., 2004). Evidências sugerem que algumas cepas que circulam em populações de roedores pode não infectar outras espécies, tais como equinos. Espécies de mamíferos de grande porte, incluindo o leão da montanha e coiotes também podem atuar como hospedeiros, porém como sentinelas primárias, já que eles não são capazes de desenvolver uma infecção crônica, não sendo capaz de servir como fonte de infecção para estágios imaturos de carrapatos. Cães e humanos são hospedeiros acidentais e a bacteremia parece ser de curta duração (< 28 dias) (BAKKEN; DUMLER, 2008). Um estudo na Eslovênia mostrou que aproximadamente 15,4% da população amostrada tinham anticorpos contra *A. phagocytophilum*, embora não houvesse diferença na prevalência entre as pessoas com exposição a cães e aquelas que não foram expostas (SKERGET et al., 2003).

2.2.3 Outras formas de transmissão de *Anaplasma phagocytophilum*

Raramente, a transmissão de *A. phagocytophilum* tem sido reportada na ausência de um carrapato vetor. Transmissão nosocomial desta rickettsia foi recentemente descrita na China (ZHANG et al., 2008). Uma investigação de um surto sugeriu que a transmissão tenha ocorrido através do contato direto com sangue e secreções respiratórias de um paciente que morreu com AGH. Infecção por *A. phagocytophilum* também foi descrita em três adultos que fizeram necropsia de mais de 250 cervídeos e, provavelmente, a infecção tenha ocorrido pelo contato com o sangue desses animais, já que não houve relato de picadas por carrapatos (BAKKEN et al., 1996b). Estudos mais recentes, entretanto, sugerem que a cepa de *A. phagocytophilum* que infectam cervídeos nos Estados Unidos é distinta da que infecta humanos, (DE LA FUENTE et al., 2005b; MASSUNG et al., 2005), então foi sugerido que as pessoas possam ter sido picadas por carrapatos (KRAUSE et al., 2008). Raros relatos descrevem também a possível transmissão transplacentária em humanos (HOROWITZ et al., 1998) ou após transfusão sanguínea (KEMPERMAN et al., 2008). Infecção perinatal por *A.*

phagocytophilum foi descrita em uma cadela de Wisconsin com feto retido e mumificado. Nenhuma evidência de infecção foi documentada em ninhadas de filhotes (PLIER et al., 2009).

2.2.4 Distribuição e Soroprevalência da Anaplasose Granulocítica Canina

Casos da AGC na América do Norte têm sido reportada na Califórnia, Washington, Illinois, Minesota, Wisconsin, Missouri e British Columbia (MADEWELL; GRIBBLE, 1982; GREIG et al., 1996; LIDDELL et al., 2003; ARSENAULT et al., 2005; LESTER et al., 2005; POITOUT et al., 2005; DRAZENOVICH et al., 2006; HENN et al., 2007; BEALL et al., 2008). Na Europa, cães infectados têm sido diagnosticados na Áustria, Itália, Suécia, Suíça, Alemanha, Polônia e Reino Unido (EGENVALL et al., 1997; GRAVINO et al., 1997; PUSTERLA et al., 1997; SKOTARCZAK et al., 2004; BEXFIELD et al., 2005; KOHN et al., 2008; MANNA et al., 2004; KIRTZ et al., 2005). Evidência de possível exposição de cães a *A. phagocytophilum* foi detectado em pelo menos 36 estados dos Estados Unidos, com soroprevalência mais elevada nos estados do Oeste, Centro-Oeste, Nordeste (HENN et al., 2007; MAGNARELLI et al., 1997; RODGERS et al., 1989; SUKSAWAT et al., 2000; FOLEY et al., 2001; BOWMAN et al., 2009).

A soroprevalência de *A. phagocytophilum* em cães tem sido avaliada mundialmente, embora nenhuma evidência molecular ou cultura positiva tenha sido documentada, até o momento, no hemisfério sul (HENN et al., 2007; BEALL et al., 2008; MAGNARELLI et al., 1997; RODGERS et al., 1989; SUKSAWAT et al., 2000; FOLEY et al., 2001; BOWMAN et al., 2009; JESSEN et al., 2007; EBANI et al., 2008; SOLANO-GALLEGU et al., 2006; TORINA et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2006; SANTOS et al., 2009a; AMUSATEGUI et al., 2008; EGENVALL et al., 2000a; PUSTERLA et al., 1998; SHAW et al., 2005; GARY et al., 2006; DINIZ et al., 2010; DE PAIVA DINIZ et al., 2007; LEVI et al., 2006; INOKUMA et al., 2001; M'GHIRBI et al., 2009, KOHN et al., 2010). A prevalência depende da população de cães amostrados, se estavam doentes ou não, se existia suspeita clínica da presença de uma doença infecciosa transmitida por vetores e também da variação geográfica no nível de exposição a carrapatos vetores e hospedeiros reservatórios. Além disso, anticorpos contra *A. phagocytophilum* reagem cruzadamente com outras espécies de *Anaplasma*, tais como *A. platys*, então a soropositividade pode não refletir necessariamente prévia exposição a *A. phagocytophilum*. Por exemplo, em um estudo que examinou 233 cães no Arizona demonstrou moderada concordância entre o resultado positivo no Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e no PCR para *A. platys*, porém nenhum cão positivo no ELISA foi positivo na PCR para *A. phagocytophilum* (DINIZ et al., 2010).

A soroprevalência em cães da Europa e América do Norte varia entre 50 a 55%, respectivamente (BEALL et al., 2008; BARUTZKI et al., 2006). Um recente estudo avaliou 400000 cães nos Estados Unidos através do teste ELISA recombinante p44/msp2 comercialmente disponível e revelou uma ampla variação na soroprevalência, com alguns municípios do Centro Oeste e Nordeste dos Estados Unidos com soroprevalência superior a 40%, embora a soroprevalência global nestas regiões tenha sido 6,7 e 5,5%, respectivamente (BOWMAN et al., 2009). No norte da Califórnia, entre 0 e 50% dos cães em oito pequenas cidades foram soropositivos para *A. phagocytophilum*, mostrando uma ampla variação na medida de exposição até mesmo em uma relativamente pequena área geográfica (FOLEY et al., 2007b). Entre as 996 amostras de soro coletadas de cães na Suíça entre março de 1991 e março de 1998, 7,5% foram positivas para *A. phagocytophilum*, com uma soroprevalência significativamente mais alta na parte sul dos Alpes Suíços (PUSTERLA et al., 1998). Embora *A. phagocytophilum* tenha sido detectado em carrapatos da China e Rússia, nenhum estudo de prevalência em cães foi realizado nestes países até o momento (CAO et al., 2000; WEN et al.,

2003; SHPYNOV et al., 2006). Evidência molecular da infecção de *A. phagocytophilum* em cães na Venezuela e Tailândia foi descrita utilizando PCR, porém subsequentemente foi determinado que esses cães foram de fato infectados por *A. platys*. O resultado falso positivo na PCR provavelmente ocorreu em função da alta carga desse organismo no sangue dos cães (SUKSAWAT et al., 2002). Evidência de exposição e infecção por *A. phagocytophilum* em cães foi recentemente diagnosticado na Tunísia, (M'GHIRBI et al., 2009) e uma bactéria proximamente relacionada a *A. phagocytophilum* foi detectada em cães na África do Sul.

2.2.5 Variação Genética de *Anaplasma phagocytophilum*

Massung et al. (2002) propuseram que as variantes genéticas descritas para as amostras de Rhode Island e Connecticut pudesse interferir com a transmissão e manutenção de estirpes que causam doença em seres humanos no Estados Unidos. A variante AP 1 foi incapaz de estabelecer infecções em camundongos sob condições de laboratório (MASSUNG et al., 2003b). Massung et al. (2003a) especularam que a menor incidência de casos humanos ocorrem em áreas onde predominam certo tipo de variante que infectam competitivamente certa espécie de reservatório ou vetores. As variantes que têm fisiologia diferente podem ter um patogenicidade diferente também. Algumas variantes podem ser mais, menos ou tão patogênicas quando comparadas com a cepa protótipo que causa doença em humanos. As variantes WA 1-5 foram identificadas a partir de cães que apresentavam manifestações clínicas compatíveis com anaplasmoze granulocítica. Essas variantes têm ainda de ser identificadas a partir de carrapatos vetores ou outros hospedeiros, inclusive humanos. Mais pesquisas serão necessárias para avaliar como a presença dessas variantes afeta a taxa de prevalência de casos da anaplasmoze granulocítica nos animais (POITOUT et al., 2005).

Existem cinco variantes genéticas de *A. phagocytophilum* identificadas em cães, com 1-2 nucleotídeos de diferença na sequência do gene 16S RNA nas posições 54, 84, 86, e 120 (POITOUT et al., 2005). Organismos detectados em dois cães da Suíça tinham a sequência do gene 16S RNA que foram idênticas, e estas sequências mostraram ser também idênticas as sequências do gene 16S RNA encontradas em humanos com anaplasmoze granulocítica (PUSTERLA et al., 1997). Os sequenciamentos de isolados caninos da Suécia também mostraram 100% de identidade com isolados humanos (JOHANSSON et al., 1995). O grau com o qual a variação genética contribui para alterar a patogenicidade de diferentes cepas de *A. phagocytophilum* é pobremente entendido.

2.2.6 Fatores de Risco para a Infecção por *Anaplasma phagocytophilum* em Cães

Áreas de alto risco para AGC coincidem com a distribuição dos casos de AGH, os quais ocorrem com maior frequência no Nordeste, extremo Oeste, e Norte da Califórnia (MADEWELL; GRIBBLE, 1982; GREIG et al., 1996; LIDDELL et al., 2003; ARSENAULT et al., 2005; LESTER et al., 2005; POITOUT et al., 2005; DRAZENOVICH et al., 2006; HENN et al., 2007; BEALL et al., 2008).

Fatores de risco para a infecção por *A. phagocytophilum* em cães inclui a estação do ano, co-infecção com outros patógenos transmitidos por carrapatos e a presença de sinais clínicos. No sudeste dos Estados Unidos, a infecção por *A. phagocytophilum* tem sido diagnosticada em cães entre os meses de abril e julho, com alguns casos ocorrendo em outubro (POITOUT et al., 2005). Para os estados de Minnesota e Wisconsin foi verificado uma distribuição sazonal bimodal da doença, a qual reflete a atividade do carrapato *I. scapularis*, no final da primavera (maio, junho) e outono (outubro, novembro) (GREIG et al., 1996; BEALL et al., 2008). Em Berlin, 17 dos 18 casos da doença foram observados nos meses de abril e setembro, com o restante ocorrendo em novembro (KOHN et al., 2008). A

distribuição sazonal da doença coincide com os picos de atividades dos estágios ninfais e adultos dos carrapatos, bem como, com os períodos que os humanos e seus cães aumentam suas atividades fora do domicílio. A proporção de cães soropositivos aumenta com a idade, de acordo com um estudo realizado na Suécia, (EGENVALL et al., 2000a) refletindo um aumento na probabilidade de exposição ao longo do tempo. A idade média de cães clinicamente doentes é de aproximadamente seis a oito anos (variando de seis meses a 14 anos) (GREIG et al., 1996; EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008). A raça Goden Retrievers compreende quase a metade dos cães infectados em um estudo, possivelmente em função da popularidade desse cão para exercer atividades extradomiciliares, (EGENVALL et al., 1997), embora outros estudos descrevem a doença em uma variedade de raças (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008).

Complicações do quadro clínico da AGC podem ocorrer em virtude da frequente exposição a múltiplos carrapatos vetores e co-infecções com outros agentes transmitidos por carrapatos. Dessa forma, a presença de anticorpos contra outros agentes transmitidos por carrapatos pode representar um fator de risco para infecção por *A. phagocytophilum*. Em um canil de Walker Hounds no sudeste da Carolina do Norte foi observado um alto grau de co-infecções com *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. e *Babesia* spp (KORDICK et al., 1999). Dos 27 cães avaliados, 26 foram soropositivos para *Ehrlichia* e *Anaplasma* spp., 16 foram soropositivos para *Babesia canis*, 25 para *Bartonella vinsonii*, 22 para *Rickettsia rickettsii* e 3 apresentaram anticorpos anti *A. phagocytophilum*. Resultado no PCR mostrou que dos 27 cães, 15 foram positivos para *E. canis*, 9 para *E. chaffeensis*, 8 para *E. ewingii*, 3 para *A. phagocytophilum* e 9 para *A. platys* (KORDICK et al., 1999).

Borrelia burgdorferi é transmitida pela mesma espécie de carrapato vetor e mantida no ciclo silvestre pelos mesmos reservatórios roedores. É descrito com frequência uma evidência de co-infecção com *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum*, e quando estão presentes ao mesmo tempo no organismo do hospedeiro, um pode aumentar a patogenicidade do outro (NIETO et al., 2009; NYARKO et al., 2006). Nos Estados Unidos, anticorpos para *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* foram mais comumente encontrados em cães na região Centro-Oeste (2,0%) seguida pela região Nordeste (1,4%) (BOWMAN et al., 2009). Em um estudo com 731 cães de uma Clínica Vetrinária em Braxter, Minnesota, 29% dos cães foram soropositivos para *A. phagocytophilum*, 11% foram para *B. burgdorferi* e 25% dos apresentaram anticorpos para ambos os agentes (BEALL et al., 2008). De 89 cães doentes, anticorpos contra *A. phagocytophilum* foram encontrados em 25%, anticorpos para *B. burgdorferi* em 9% e anticorpos para ambos os agentes em 43% dos cães. Na Califórnia, cães que foram soropositivos para *A. phagocytophilum* tiveram 18,2 vezes mais chance de serem soropositivos para *B. vinsonii* quando comparado com cães que foram soronegativos para *A. phagocytophilum* (FOLEY et al., 2007b).

2.3 Patogenia de *Anaplasma phagocytophilum*

A AGC é uma infecção auto-limitante, por esse motivo existe uma escassez de informações disponíveis sobre a patologia de *A. phagocytophilum* em cães. Lesões teciduais parecem resultar de uma resposta inflamatória pelo hospedeiro, ao invés da própria ação da bactéria (DUMLER et al., 2007). Informações sobre a ação patológica dessa bactéria em humanos também é limitada. No entanto, tem sido descritos em humanos, depleção linfóide esplênica, agregados de macrófagos e apoptose no fígado, hiperplasia linfóide paracortical e células hemofagocíticas dentro dos tecidos do sistema reticuloendotelial (LEPIDI et al., 2000). Dumler et al. (2007) descreveram a morte de um equino após a infecção experimental com um isolado Sueco de *A. phagocytophilum*. Na necropsia foi observada hemorragia intratorácica, petéquias generalizadas e equimoses. As principais alterações microscópicas

constituíram-se de vasculite necrotizante e trombose hialina, com infiltração perivascular de células mononucleares. No fígado, foram observados agregados dispersos de células inflamatórias nos sinusóides hepáticos e evidência de apoptose de hepatócitos. As alterações vasculares, neste caso foram sugestivas de coagulação intravascular disseminada, que também tem sido relatada em seres humanos com anaplasiose granulocítica (BAKKEN et al., 2008). É possível que o dano tecidual possa resultar das substâncias liberadas pelos neutrófilos infectados ou através da indução de atividade pró-coagulante de monócitos teciduais (BEHL et al., 2000). A ativação dos macrófagos durante a AGH é evidenciada pela alta concentração de ferritina, IL-10, IL-12 p70, e interferon γ (IFN- γ) no soro, bem como pela evidência de hemofagocitose em indivíduos infectados (DUMLER et al., 2007).

Para que *A. phagocytophilum* possa ser transmitido transtetadialmente por carrapatos é necessário que permaneça fixado sobre a pele do hospedeiro por 36-48 horas (KATAVOLOS et al., 1998; POPOV et al., 1998). O organismo 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 (POPOV et al., 1998; LAI et al., 2009). Estudos utilizando neutrófilos de humanos demonstraram que a bactéria fixa-se a ligantes do ácido siálico na superfície do neutrófilo, tais como o ligante-1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1) e penetra nos neutrófilos através da endocitose mediada por caveólos (GOODMAN et al., 1999; RIKIHISA et al., 2006). Caveólos são jangadas de lipídeos enriquecidas de proteínas e lipídeos, os quais executam diversas funções de sinalização celular. O uso dessa porta de entrada permite que a bactéria entre na célula do hospedeiro sem passar pela via do fagolisossomo (RIKIHISA et al., 2006). Recentes trabalhos sugerem que *A. phagocytophilum* possui um sistema de dois componentes utilizando como sinalizador o di-GMP cíclico, que é essencial para a infecção e adaptação no interior da célula hospedeira (LAI et al., 2009). A fim de garantir sua sobrevivência e replicação intracelular, *A. phagocytophilum* desregula ativamente as principais funções bactericidas dos neutrófilos. A bactéria é capaz de inibir a produção de superóxido pelos neutrófilos através do bloqueio do sistema multicomponente NADPH oxidase na membrana e a detoxificação do ânion superóxido (RIKIHISA et al., 2006; CARYON et al., 2006). A proteína bacteriana Anka, aparentemente, entra no núcleo e interage com as regiões reguladoras do gene, diminuindo a expressão de genes de defesa do hospedeiro, incluindo gp91^{phox}, um componente da NADPH oxidase (GARCIA-GARCIA et al., 2009). *A. phagocytophilum* possui a capacidade de diminuir a mobilidade e a fagocitose de neutrófilos, (GARYU et al., 2005) e também diminui a aderência endotelial e a transmigração de neutrófilos, que normalmente ocorre por meio de rolamento mediado por selectina, ativação celular e ligação via moléculas de integrinas de superfície. Em contraste, uma pesquisa que avaliou a função de neutrófilos de cães infectados com um isolado Sueco de *A. phagocytophilum* revelou não haver alteração na capacidade de fagocitose dos neutrófilos infectados (LILIEHOOK et al., 1999). A diminuição da aderência de neutrófilos às células endoteliais parece ser resultado da perda de PSGL-1 e dos ligantes de L-selectina pelos neutrófilos infectados, no momento em que b2-integrina, imunoglobulina da superfamília das moléculas de adesão, e a molécula de adesão intercelular estão sendo super expressadas (CHOI et al., 2003). Estes mecanismos promovem a sobrevivência do patógeno no sangue periférico do hospedeiro infectado.

Normalmente, os neutrófilos circulam por 10-12 horas antes de entrarem em tecidos e morrerem por apoptose, e dessa forma torna-se um local desfavorável para a maioria dos patógenos. Notavelmente, *A. phagocytophilum* é capaz de retardar a apoptose de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*, permitindo que ele sobreviva e forme mórulas dentro de leucócitos (RIKIHISA et al., 2006; CARLYON et al., 2006; YOSHIIE et al., 2000; LEE et al., 2008).

Embora o mecanismo de transferência dessa bactéria célula a célula não seja conhecido, o organismo induz a liberação de interleucina 8 (IL-8) em humanos infectados, bem como o aumento da expressão de CXCR2 na superfície celular, um receptor de IL-8 que pode levar ao recrutamento de neutrófilos mais suscetíveis a infecção pelo patógeno para posteriormente serem ingeridos por carrapatos não infectados (AKKOYUNIU et al., 2001; SCORPIO et al., 2004). Além disso, *A. phagocytophilum* pode infectar células humanas da medula óssea CD341, células endoteliais (KLEIN et al., 1997; MUNDERLOH et al., 2004) e células da linhagem megacariocítica (GRANICK et al., 2008). Estas células podem também servir como um reservatório celular potencial para transferência célula-célula da bactéria para os neutrófilos no sangue periférico.

2.4 Alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados por *Anaplasma phagocytophilum*

A infecção por *A. phagocytophilum* é mais comumente associada com o desenvolvimento de trombocitopenia leve a moderada, embora outras citopenias também possam ocorrer, incluindo neutropenia, linfopenia e anemia leve. O mecanismo destas alterações hematológicas permanece obscuro. *A. phagocytophilum* pode penetrar nas células da linhagem megacariocítica, que também expressam PSGL-1, porém tal infecção parece não prejudicar a capacidade dos megacariócitos em produzir plaquetas (GRANICK et al., 2008). Anticorpos antiplaquetários foram detectados no soro de humanos (WONG et al., 1998) e cães (KOHN et al., 2008) com anaplasiose granulocítica, e mecanismos imunológicos mediados podem contribuir para a trombocitopenia. No entanto, a trombocitopenia ocorre na doença aguda, antes que os anticorpos sejam detectados, e em ratos sem células T ou B (deficiência imune severa combinada), sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos (BORJESSON et al., 2001).

Insuficiência da função de neutrófilos e leucopenia como resultado de infecção por *A. phagocytophilum* podem predispor ao desenvolvimento de infecções secundárias oportunistas. Este fato tem sido melhor documentado em ovinos e bovinos com anaplasiose granulocítica na Europa. *A. phagocytophilum* em cordeiros pode predispor e acentuar a piemia, que é caracterizada por claudicação e paralisia causada por *Staphylococcus aureus*, (FOGGIE et al., 1956) *Pasteurella* spp., (GILMOUR et al., 1982; OVERÁS et al., 1993) e *Listeria monocytogenes* (GRONSTOL et al., 1980). Infecções oportunistas também foram documentadas como uma possível causa de mortalidade em humanos e cães com anaplasiose granulocítica (BAKKEN et al., 2008; CARLYON et al., 2006; LEPIDI et al., 2000), porém com menor frequência do que as descritas em ruminantes. Insuficiência da função de neutrófilos em humanos infectados com *A. phagocytophilum* pode aumentar a severidade da doença resultante de uma infecção por *B. burgdorferi* (NYARKO et al., 2006).

A alteração laboratorial mais consistente é a trombocitopenia, que ocorre em aproximadamente 90% dos cães infectados (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008). A contagem de plaquetas em cães trombocitopênicos varia de 5.000 a 164.000 platelets/mL (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008; EGENVALL et al., 1997). A medula óssea de cães infectados contém um aumento absoluto no número de megacariócitos e megacariócitos imaturos, sugerindo que a trombocitopenia possa ocorrer devido à destruição das plaquetas (LILLIEHOOK et al., 1998). A maioria dos cães afetados tiveram linfopenia, com linfocitose sendo relatadas raramente (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008). Anemia leve e regenerativa foi relatada em três de oito cães em Washington e dois de 15 cães no Norte dos Estados Unidos. Em contraste, 11 dos 18 cães na Alemanha estavam anêmicos, com hematócritos variando de 19 a 39% (média 32%) (KOHN et al., 2008). Tanto neutrofilia quanto neutropenia foram relatados,

embora a maioria dos cães infectados por *A. phagocytophilum* apresentaram contagem de neutrófilos na metade inferior do intervalo de referência (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; EGENVALL et al., 1997). Monocitopenia tem sido relatada em cerca de um terço dos cães infectados provenientes dos Estados Unidos (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005), no entanto vários cães da Alemanha apresentavam monocitose (KOHN et al., 2008). Hipoalbuminemia leve, hiperglobulinemia e um ligeiro aumento na atividade das enzimas hepáticas (especialmente fosfatase alcalina) são mais comumente observada no perfil bioquímico do soro de cães infectados (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; GRAVINO et al., 1997; EGENVALL et al., 1997). Alta atividade da fosfatase alcalina foi relatada em 88% dos cães infectados na América do Norte e em 61% dos cães em um estudo na Alemanha. A hiperbilirrubinemia esteve presente em cinco dos 22 cães com anaplasmoses granulocítica na Europa (KOHN et al., 2008), porém não tem sido relatada em cães da América do Norte. As diferenças na apresentação clínica da AGC na Europa e na América do Norte pode ser um reflexo de diferentes cepas de *A. phagocytophilum*, como já foi relatado para bovinos e ovinos (PUSTERLA et al., 1999b; STUEN et al., 2003).

2.5 Resposta Imune contra *Anaplasma phagocytophilum*

A resposta imune à infecção por *A. phagocytophilum* não está totalmente caracterizada. A produção de IFN- γ desempenha um importante papel no controle inicial da infecção por *A. phagocytophilum* (AKKOYUNLU et al., 2000; BIRKNER et al. 2008), embora possa também contribuir para o processo inflamatório associado com a doença (MARTIN et al., 2001). A produção de IFN- γ pode ser desencadeada pela liberação de IL-12 e IL-18 (PEDRA et al., 2007a; PEDRA et al., 2007b). Linfócitos T natural killer podem ser a principal fonte de IFN, com células dendríticas produzindo IL-12 e IL-18. Em um modelo murino de infecção, a depuração bacteriana final pareceu ser dependente de células T CD41, e não dependem de citocinas produzidas por células Th1, como IL-12 e IFN- γ (BIRKNER et al., 2008). A imunidade mediada por células-T geralmente é considerada o braço mais importante do sistema imunológico para o combate de patógenos intracelulares, mas os dados gerados a partir de modelos murinos sugerem um papel importante para a imunidade humoral na depuração de Ehrlichiae, incluindo *A. phagocytophilum* (WINSLOW et al., 2005; SUN et al., 1997). Os anticorpos podem ser produzidos após a exposição às bactérias nas fases extracelulares da infecção, podendo atuar em componentes intracelulares contendo Ehrlichiae ou aumentar a atividade fagocitária (WINSLOW et al., 2005). Tanto as células B quanto T são necessárias para eliminar a infecção, já que camundongos com imunodeficiência severa combinada, faltando tanto células B quanto T, permanecem persistentemente infectados. Em contraste, os camundongos com deficiência isolada de células T podem debelar a infecção (BIRKNER et al., 2008). Em ovinos, *A. phagocytophilum* é capaz de evadir a resposta imune do hospedeiro através da expressão diferencial de MSP2, uma proteína da superfície externa envolvida no reconhecimento imunológico, como tem sido documentado para infecções em bovinos com *A. marginale* (GRANQUIST et al., 2008; BARBET et al., 2000). Investigações adicionais são necessárias para elucidar se a persistência ocorre através de mecanismos similares em outras espécies hospedeiras.

2.6 Manifestações Clínicas em Cães infectados com *Anaplasma phagocytophilum*

A maioria dos cães naturalmente infectados com *A. phagocytophilum* 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). Até o momento, não existem relatos de caso de mortes em cães. Quatro séries de casos descrevem

as características clínicas da infecção natural em 18 cães examinados na Alemanha (KOHN et al., 2008), 14 na Escandinávia (EGENVALL et al., 1997), 8 no estado de Washington (POITOUT et al., 2005), 17 no extremo Oeste dos Estados Unidos (GREIG et al., 1996), juntamente com vários relatos, incluindo três cães ou menos nos Estados Unidos, Itália, Colúmbia Britânica, Suíça, Áustria, e a Inglaterra (MADEWELL et al., 1982; ARSENAULT et al., 2005; LESTER et al., 2005; GRAVINO et al., 1997; PUSTERLA et al., 1997; BEXFIED et al., 2005; MANNA et al., 2004; KIRTZ et al., 2005; PLIER et al., 2009).

Outros relatos descrevem a doença em cães associado com mórulas em granulócitos não distinguindo entre *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* (COWELL et al., 1988; STOCKHAM et al., 1992; MARETZKI et al., 1994; GODMAN et al., 1998; TARELLO et al., 2003). Alguns desses cães eram oriundos de regiões dos Estados Unidos, onde a infecção por *A. phagocytophilum* não é endêmica. Um relato no sudeste dos Estados Unidos descreveu a detecção molecular de *E. ewingii* em 2 de 6 cães com mórulas granulocítica e detecção de um organismo semelhante a *E. canis* em outro, no entanto os ensaios de PCR para *A. phagocytophilum* foram negativos nos 3 cães testados (GODMAN et al., 1998). Para os cães, inclusões granulocítica causada por *A. phagocytophilum* deve ser diferenciada de inclusões granulocítica causada por *E. ewingii*. Infecções em cães por *E. ewingii* são observadas no Sul dos Estados Unidos e são responsáveis por uma desordem poliartítica aguda caracterizada por febre, anorexia, claudicação, trombocitopenia leve sem diátese hemorrágica e anemia não regenerativa leve (GODMAN et al., 1998). Atualmente, os cães com infecções *E. ewingii* são identificados pela presença de anticorpos que são reativos aos antígenos de *E. canis* e por PCR-específicos para *E. ewingii*. Geralmente antígenos de *A. phagocytophilum* não produzem anticorpos que reagem com antígenos de *E. ewingii*. Portanto, os cães nos EUA podem ser infectados por dois agentes distintos que infectam granulócitos: *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* e que causam a AGC e a Ehrlichiose Granulocítica Canina, respectivamente. *E. ewingii* infecta neutrófilos e eosinófilos, mas é antigenicamente e geneticamente relacionada com *E. canis* (ANDERSON et al., 1992; DUMLER et al., 2001).

Os sinais clínicos mais comuns em cães infectados com *A. phagocytophilum* que desenvolvem doença são letargia e febre, que ocorre após um período de incubação de uma a duas semanas. Letargia tem sido descrita em quase todos os cães infectados (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008; EGENVALL et al., 1997). Diversos estudos reportam que o sintoma de febre que esteve presente em 90% dos cães infectados (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; EGENVALL et al., 1997). Inapetência ou anorexia foi observado em 47 a 88% dos cães infectados por *A. phagocytophilum* (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008). Sintomas músculo-esqueléticos, tais como relutância para se movimentar e manqueira também já foram descritos. Em alguns cães, a manqueira pode resultar de uma poliartrite neutrofílica (SKOTARCKAK et al., 2004; FOLEY et al., 2007a).

Com menor frequência foram descritos sintomas como, polidipsia, palidez de mucosas, sinais gastrointestinais, incluindo vômitos, diarréia e hemorragia, que se manifestam como petéquias na mucosa, melena, ou epistaxe em cães infectados por *A. phagocytophilum* (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008). Esplenomegalia e linfadenopatia discreta, detectada durante o exame físico ou após radiografia e ultrasonografia, podem também estar presentes (GREIG et al., 1996; KOHN et al., 2008). Em cães e em modelos murinos de infecção a esplenomegalia e linfadenopatia aparecem em função da hiperplasia linfóide reativa e, no baço, pela hematopoese extramedular (ENGEVALL et al., 1998; HODZIC et al., 1998).

Manifestações neurológicas têm sido raramente descritas em pessoas com AGH, quando o organismo foi detectado no fluido cefalorraquidiano (LEE et al., 2000). Greig et al. (1996) descreveram em 2 dos 17 cães com anaplasmoose granulocítica sinais neurológicos que

consistiam em convulsões e déficits proprioceptivos, porém o cão que apresentava convulsão tinha um histórico de epilepsia idiopática. Em um estudo retrospectivo com 248 cães que apresentavam distúrbios do sistema nervoso não foi verificada associação entre sinais neurológicos e infecção por *A. phagocytophilum* em cães (JADERLUN et al., 2007). Uma mórula granulocítica foi detectada por meio da citologia no LCR de um cão com meningite na Califórnia. Os títulos de anticorpos séricos neste cão foram maiores para *E. canis* (40.960), seguido por *R. rickettsii* (5120) e *A. phagocytophilum* (40) (MARETZKI et al., 1994). Estudos moleculares não foram realizados, de modo que é possível que este organismo seja *E. ewingii*.

A infecção por *A. phagocytophilum* parece ser auto-limitante em cães e a doença crônica ainda não foi descrita. A forma pela qual *A. phagocytophilum* persiste nos tecidos e contribui para manifestações da doença crônica em pacientes humanos e caninos é objeto de investigações futuras. Em um estudo, o tratamento com prednisolona por 6 meses em cães que foram experimentalmente infectados com *A. phagocytophilum* foi associado com o desenvolvimento de resultados positivos na PCR para o organismo e, em alguns cães, observou-se o reaparecimento de mórulas em esfregaços de sangue, além de trombocitopenia (EGENVALL et al., 2000b). Em outro relato, a infecção persistente foi observada em cães, apesar do tratamento com doxiciclina, já que os cães foram positivos na PCR após o tratamento com prednisolona cinco semanas após a terapia de doxiciclina. No entanto, não se sabe se organismos viáveis estavam presentes, conforme determinado por meio de cultura ou em estudos de inoculação em animais de laboratório (EGENVALL et al., 2000b).

2.7 Diagnóstico da Anaplasose Granulocítica Canina

Os critérios de diagnóstico para confirmação da AGC são os sinais clínicos e achados laboratoriais sugestivos de anaplasose granulocítica juntamente com: (1) detecção de mórulas em neutrófilos combinado com um título de anticorpos para *A. phagocytophilum* (1:80), (2) aumento de 4 vezes ou diminuição do título de anticorpos dentro de 4 semanas (3); Resultado positivo da PCR utilizando primers específicos para *A. phagocytophilum*, ou (4) o isolamento de *A. phagocytophilum* do sangue em cultivo celular (BAKKEN et al., 2008). Vale ressaltar que o isolamento não é utilizado rotineiramente para o diagnóstico da AGC.

Mórulas podem ser vistas dentro de neutrófilos durante o exame citológico do esfregaço de sangue periférico corados por derivados de Romanowsky. O achado de mórulas em neutrófilos no sangue periférico de cães em uma área endêmica é altamente sugestivo de infecção por *A. phagocytophilum*, embora as mórulas não possam ser distinguidas de *Ehrlichia* spp., tais como *E. ewingii*. Neste caso, testes sorológicos ou PCR são necessários para confirmar se *A. phagocytophilum* é a espécie infectante (TARELLO et al., 2005; PLIER et al., 2009; PUSTERLA et al., 1998). O percentual de neutrófilos que contém mórulas durante a fase aguda da infecção varia de 7 a 32% (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; 1997; EGENVALL et al., 1997). Em cães experimentalmente infectados, neutrófilos infectados começam a aparecer quatro dias após a inoculação e persistem por quatro a oito dias (EGENVALL et al., 1998).

Vários testes de PCR convencional e em tempo real têm sido desenvolvidos para a detecção de DNA de *A. phagocytophilum* no sangue periférico, capa leucocitária, medula óssea ou amostras de tecido esplênico. Alguns destes ensaios amplificam o DNA de outras espécies de rickettsias e o sequenciamento do produto da PCR é necessário para determinar se *A. phagocytophilum* é a espécie infectante. Outros ensaios apenas amplificam o DNA de *A. phagocytophilum*. Os alvos da maioria dos testes utilizados, tem sido o gene 16S rRNA ou o gene da proteína de superfície externa MSP2 (p44). Ensaios baseados no gene *msh2* são geralmente específicos para *A. phagocytophilum*, enquanto os ensaios com base no gene 16S

rRNA podem detectar outras espécies de *Anaplasma* e até mesmo outras bactérias como *Bartonella henselae* (EGENVALL et al., 2000b). Outros ensaios relatados têm como alvo os genes *msp4*, *groEL*, *rrs*, *epank1* ou *ankA* de *A. phagocytophilum* (MASSUNG et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2008; SANTOS et al., 2004; WALLS et al., 2000). Um ensaio em tempo real foi desenvolvido para amplificar o gene *msp2* de uma ampla variedade de cepas isoladas de diferentes locais (DRAZENOVICH et al., 2006). O DNA de *A. phagocytophilum* foi amplificado em um estudo usando PCR em 3% dos cães saudáveis e em 37% dos cães clinicamente doentes (BEALL et al., 2008). Após o tratamento, todos os cães em um estudo tornaram-se negativos na PCR dando suporte a uma associação entre resultados positivos na PCR e clínica da doença (KOHN et al., 2008). Em cães experimentalmente infectados, os resultados da PCR em sangue total foram positivos em seis a oito dias antes e três dias depois do aparecimento de mórulas no esfregaço sanguíneo (EGENVALL et al., 1998; EGENVALL et al., 2000b).

O diagnóstico também pode ser realizado utilizando sorologia pareada, aguda e de convalescença. A maioria dos laboratórios veterinários realizam testes sorológicos através de técnicas de imunofluorescência. Anticorpos da classe IgG são detectáveis em aproximadamente oito dias após a exposição inicial e dois a cinco dias após o aparecimento de mórulas. Como resultado, durante a doença aguda, os anticorpos podem ser inaparentes, assim a PCR pode ser mais útil para o diagnóstico de infecção aguda, quando mórulas não estão presentes. Para que títulos positivos para *A. phagocytophilum* possam refletir uma exposição anterior é exigido a demonstração de um aumento de 4 vezes no título. Os títulos de anticorpos podem persistir por vários meses (EGENVALL et al., 1997; EGENVALL et al., 2000a). Foi verificada em um estudo que a soropositividade persistiu até 12 meses após a resolução da doença aguda (POITOUT et al., 2005). Tem sido descrito em seres humanos a persistência de anticorpos por até três anos (BAKKEN et al., 2008). Um ELISA polivalente foi desenvolvido baseado em antígeno recombinante *p44*, sendo apropriado para testar soros de cães e equinos (MAGNARELLI et al., 2001). Um outro teste ELISA desenvolvido a partir de uma proteína recombinante *msp2/p44*, também está disponível para a detecção de anticorpos contra o *A. phagocytophilum* no soro de cães. Resultados positivos com este teste não significa que *A. phagocytophilum* é a causa da doença em cão. Além disso, com os testes de imunofluorescência indireta, os resultados negativos podem ocorrer em cães que apresentam doença aguda, pois ocorre um atraso na produção de anticorpos em relação ao início dos sinais clínicos.

Sorologia cruzada entre *Anaplasma phagocytophilum* e diferente espécies do gênero *Anaplasma* pode ocorrer. Reatividade cruzada foi documentada entre *A. phagocytophilum* e *A. marginale* em 100% das amostras testadas pelo ELISA indireto, mas nenhuma reatividade cruzada foi documentado quando o teste ELISA competitivo foi utilizado (STRIK et al., 2007). Cães infectados com *A. platys* também foi positivo quando um teste sorológico para *A. phagocytophilum* foi utilizado, incluindo um ensaio com o antígeno recombinante MSP2 (BOWMAN et al., 2009). 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).

Em um estudo comparativo, amostras de sangue de cães suspeitos de estarem infectados com *A. phagocytophilum* foram testados por imunofluorescência indireta, PCR utilizando como alvo o gene 16S rRNA e por exame de esfregaço de sangue. Um total de 73% dos animais foram positivos pela PCR e no exame citológico de inclusões, também apresentaram anticorpos anti-*A. phagocytophilum*, enquanto que 34 de 36 amostras (94%) que foram positivos no esfregaços de sangue também foram positivas na PCR. Assim, em alguns casos, o uso de múltiplas ferramentas de diagnóstico podem ser necessárias para confirmar o diagnóstico da anaplasmoose granulocítica (EGENVALL et al., 1996).

Anaplasma phagocytophilum isolado de cães e de seres humanos podem ser facilmente cultivado em linhagens de células promielocítica de leucemia humana (HL-60) e em linhagens de células embrionárias de carrapatos. Embora o cultivo celular seja a modalidade mais sensível de diagnóstico para detecção de infecção aguda em pacientes humanos, (AGUERO-ROSENFELD et al., 2002) este método não é usado rotineiramente em cães para fins de diagnóstico.

2.8 Anaplasmoze Granulocítica Humana e Sua Importância para Saúde Pública

A AGH é uma doença febril que se assemelha com a doença em cães e tem sido descrita como doença semelhante a gripe após a picada por carrapatos (BAKKEN et al., 1996a). Os homens são mais frequentemente infectados quando comparados com as mulheres (DUMLER et al., 2007) e acima de 75% das pessoas infectadas apresentam histórico de infestação por carrapatos (BAKKEN; DUMLER, 2008). Como em cães, co-infecções com *B. burgdorferi* pode ocorrer. A soroprevalência em indivíduos picados por carrapatos nos Estados Unidos é de 8,9 a 36% (BAKKEN; DUMLER, 2008), com a incidência mais alta no Centro-Oeste e Nordeste dos Estados Unidos. Na Europa, a doença tem sido reportada com maior frequência na Suécia e Eslovênia, onde o primeiro caso foi descrito em 1997 (PETROVEC et al., 1997; STRLE, 2004). Mórulas podem ser observadas com menor frequência em seres humanos com anaplasmoze granulocítica na Europa. Nesse continente a doença é um pouco mais suave quando comparada com a doença na América do Norte (BLANCO; OTEO. 2002).

Os sinais clínicos comumente relatados em pacientes humanos são mialgia, cefaléia intensa, muitas vezes mal-estar, calafrios e tremores, anorexia, náusea, artralgia, e tosse também podem ocorrer (BAKKEN; DUMLER, 2008; BAKKEN et al., 1996a; DUMLER et al., 2007). A doença geralmente é leve e auto-limitante. Ocasionalmente, a forma mais grave da doença pode ocorrer, com até 17% dos seres humanos afetados que necessitam de internação em unidade de terapia intensiva. A morte ocorre em menos de 1% dos seres humanos clinicamente afetados, geralmente como resultado de complicações, como a síndrome séptica ou choque tóxico, insuficiência respiratória, infecções fúngicas ou viral oportunistas, rabdomiólise, insuficiência renal aguda, hemorragia e doenças neurológicas (BAKKEN; DUMLER, 2008). A forma grave da doença tende a ocorrer em humanos de idade avançada, ou naqueles com doença imunossupressora concomitante ou terapia medicamentosa.

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). Nos Estados Unidos, a doença é relatável ao Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC). Os cães agem como sentinelas para a exposição humana, e têm potencial para ser uma fonte de infecção para carrapatos que podem infestar humanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da região estudada

O estudo foi realizado na microrregião de Itaguaí, pertencente à mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro (Figura 1).

- **Microrregião de Itaguaí** (Municípios de Itaguaí e Seropédica)

Coordenadas geográficas:

Itaguaí: 22°51'08'' latitude Sul; 43°46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros.

Seropédica: 22°44'38'' latitude Sul; 43°42'27'' longitude Oeste; altitude: 26 metros.

A microrregião de Itaguaí possui um clima tropical com estação seca e chuvas no verão (Aw) e com estação de inverno bem definida de acordo com a classificação de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007). Na microrregião de Itaguaí a temperatura média do mês mais frio do ano é inferior a 18°C e temperatura média máxima é superior a 25°C.



Figura 1. Localização geográfica da microrregião de Itaguaí e os municípios de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro. Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Microrregi%C3%A3o_de_Itagua%C3%AD

3.2 Tamanho da amostra e amostragem

Pela ausência de dados referentes à prevalência de *A. phagocytophilum* no Brasil, admitiu-se uma prevalência esperada de 50%, intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%. Assim, o número mínimo de amostra estabelecido para coleta foi de 384, segundo a equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

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

onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada.

A coleta das amostras foi realizada por conveniência não probabilística, onde as residências ou propriedades rurais foram visitadas e, após consentimento do proprietário ou responsável, as amostras de sangue e carrapatos foram coletadas. O número total de amostras

de sangue de cães coletadas na microrregião de Itaguaí foi de 398, distribuídas da seguinte forma: Itaguaí (n=136) e Seropédica (n=262).

Para determinar a ocorrência de *A. phagocytophilum* em uma população de carrapatos o tamanho da amostra foi determinado considerando a prevalência de 10% de carrapatos infectados em uma população infinita (baseado no valor de prevalência máxima reportado para *E. chaffeensis* no carrapato *A. americanum*) (BURKET et al. 1998; WHITLOCK et al., 2000). Assim, o número mínimo de carrapatos, com precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%, a ser testado foi de 138. No entanto, o número de carrapatos avaliados no presente estudo foi de 235.

3.3 Questionários

Antes da coleta de sangue e carrapatos dos cães, os proprietários ou funcionários responsáveis foram informados sobre o estudo, sua importância e que suas propriedades foram escolhidas para a realização do estudo. Um questionário semi-estruturado foi elaborado e pré-testado com objetivo de aperfeiçoá-lo quanto à complexidade das perguntas, sequenciamento lógico de acordo com os objetivos, maximização da clareza e adição de eventuais perguntas ou itens que pudessem servir como auxílio na obtenção de informações. Foram determinados os temas a serem abordados e algumas questões foram realizadas para serem confrontadas com as respostas dos proprietários e avaliada a coesão das mesmas. Com as informações obtidas através do questionário foi possível identificar fatores associados (Ex: idade, sexo, raça, infestação por carrapatos, etc) com a infecção por *A. phagocytophilum* diagnosticada através da PCR em tempo real nos cães estudados (ANEXO A).

3.4 Obtenção das amostras de sangue e carrapatos

De cada animal foram coletados 5mL de sangue em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) através da punção da veia cefálica. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2500xg por 5 minutos e a capa leucocitária foi separada, alíquotada em microtubos de 1,5mL, identificada e armazenada a -20°C até o momento da extração de DNA.

Todos os animais foram inspecionados visualmente por todo o corpo, com ênfase na região do pavilhão auricular, da cabeça, do pescoço, do peitoral, das axilas, inguinal e por fim, embaixo da cauda, para identificação de carrapatos. Nos animais parasitados, o grau de infestação por carrapatos foi categorizado da seguinte forma: infestação baixa (< cinco carrapatos), infestação moderada (\geq cinco<15 carrapatos), infestação alta (\geq 15<30 carrapatos), infestação muito alta (\geq 30 carrapatos). Os carrapatos coletados sobre os cães foram acondicionados em tubos contendo álcool isopropílico para preservação. Em seguida os carrapatos adultos foram identificados em nível de espécie utilizando a chave dicotômica de Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Batestti et al. (2006). Os estágios ninfais dos carrapatos do gênero *Amblyomma* foram identificados até o nível de gênero.

3.5 Extração de DNA de amostras de capa leucocitária e carrapatos

A extração de DNA total, a partir de 70 μ L da capa leucocitária, foi realizada com o auxílio de Kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Em uma etapa anterior a extração de DNA, os carrapatos foram separados de acordo com a sua espécie, sexo, estágio evolutivo, animal fonte, data da coleta e localidade de

procedência. O material genômico dos carrapatos adultos foi extraído a partir de um único exemplar, o DNA das ninfas foi extraído a partir de um “pool de carrapato” de cinco exemplares. A extração de DNA dos carrapatos foi realizada de acordo com o protocolo utilizado na extração de DNA em plantas proposto por Ferreira; Grattapaglia (1998) com pequenas modificações (ANEXO B).

3.6 Quantificação e pureza das amostras de DNA

A determinação da concentração e pureza do DNA total de todas as amostras de capa leucocitária e carrapatos foi realizada através de espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Cientific). As amostras com a relação de absorvância 260 nm/280 nm menor que 1,8 foram purificadas conforme protocolo descrito por Sambrook et al. (2001).

Todas as amostras de DNA foram diluídas de modo a obter uma concentração final de 30ng/μL.

3.7 Obtenção dos controles positivos

Os controles positivos para *A. phagocytophilum*, *N. risticii* e *R. rickettsii* foram obtidos a partir do substrato antigênico presente em lâminas preparadas para imunofluorescência, disponíveis comercialmente (Fuller Laboratories, Fullerton, CA, USA). O material genômico (DNA total) presente nessas amostras foi extraído das lâminas com auxílio do kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, com pequenas modificações (ANEXO C). O DNA extraído foi alíquotado em microtubos de polipropileno de 0,6mL estéreis, identificados e armazenados a -20° C, para utilização na PCR.

As amostras de DNA de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli* e *Hepatozoon canis* foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares da Universidade Federal de Goiás.

As amostras de DNA de *Theileria equi* e *Babesia caballi* foram obtidas a partir da extração de DNA total de amostras de sangue criopreservadas no laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ. A extração do DNA total foi realizada a partir de 200μL de sangue através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA).

3.8 PCR em tempo real das amostras de DNA de cão

As amostras de DNA dos cães foram submetidas à PCR em tempo real para a amplificação de um fragmento de 122pb do gene *msp2*, específico para a espécie *A. phagocytophilum*. Para esta análise, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores 903f 5'-AGT TTGACTGGAACACACCTGATC-3' e 1024r 5'-CTCGTAACCAATCTCAAGCTCAAC-3' (DRAZENOVICH et al., 2006). Todas as reações foram realizadas em triplicata e em volume final de 12μL, contendo: 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix, 0,9μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3μL (aproximadamente 90ng) de DNA total. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo da reação. O programa de amplificação foi composto por um passo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, uma curva de dissociação foi obtida para verificar a especificidade da amplificação. Foram consideradas positivas amostras com limiar de detecção (C_T) inferior a 35 ciclos, cujo produto amplificado apresentou a mesma temperatura de dissociação do controle positivo. O produto

da PCR das reações positivas foi submetido à eletroforese em Gel de Agarose a 2% e corado com brometo de etídio para confirmação da amplificação do fragmento de tamanho esperado.

3.9 PCR em tempo real das amostras de DNA de carrapato

As amostras de DNA total dos carrapatos foram submetidas à amplificação de 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum* através do sistema TaqMan real-time PCR. As reações foram realizadas em volume final de 12 μ L contendo: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2pmol dos *primers* 903f e 1024r, 100pmol 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-tetrametil-rodamina), 3 μ L de amostra de DNA total de carrapato (aproximadamente 90ng) e água ultra pura em quantidade suficiente para completar 12 μ L de volume final. As reações foram realizadas em triplicata no aparelho StepOnePlus™ 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.

3.10 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. Ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as fases do experimento, e os procedimentos de extração de DNA, clonagem, e as reações de PCR foram realizadas em salas separadas. Todas as reações de PCR foram realizadas em sistema fechado.

3.11 Clonagem e seqüenciamento

As amostras positivas na PCR em tempo real foram submetidas novamente a amplificação de 122pb do gene *msp2* através de uma touchdown PCR. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 μ L contendo: 5,0 μ L do tampão da PCR (10mM Tris-Cl (pH=8,3), 50mM KCl) (Invitrogen®), 3,0mM (MgCl₂ -50 mM, Invitrogen®), 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM) (Invitrogen®), 0,2 μ M dos *primers* 903f e 1024r (DRAZENOVICH et al. 2006), 0,05% de Tween 20 10%, 5,0% de Glicerol 87%, 1,5U de *Platinum* Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) e 5,0 μ L da amostra de DNA (aproximadamente 150ng de DNA total). O programa de amplificação constituiu de um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 10 ciclos com temperatura de desnaturação de 95 °C por 30s, temperatura de anelamento começando em 65 °C com decréscimo de 0,5 °C a cada ciclo e terminando em 60 °C por 20s em cada ciclo, temperatura de extensão de 72 °C por 20s, seguido de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 95 °C, anelamento a 60 °C por 20s, extensão a 72 °C por 20s e extensão final a 72 °C por 2 min.

Os produtos da PCR foram purificados, em seguida clonados e sequenciados (SANGER et al., 1977). A clonagem foi realizada em vetor pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial dos clones positivos foram isolados pelo kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Invitrogen, Carlsband, CA, USA.) seguindo as recomendações do fabricante e em seguida foram enviados para o sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP) (ABI 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA). A identidade do fragmento de 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum*

sequenciado no presente estudo foi analisada através do alinhamento múltiplo utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

3.12 Sensibilidade e especificidade analítica da PCR utilizando SYBR Green para detecção da amplificação de *Anaplasma phagocytophilum* em amostras de capa leucocitária em cães

A sensibilidade analítica do ensaio foi determinada pela avaliação de diluições decimais seriadas do amplicon clonado em plasmídeo pGEM-T (BELL; PATEL, 2005). A sensibilidade da PCR em tempo real foi avaliada com e sem a adição de 1µL de DNA extraído da capa leucocitária de um cão não infectado. A concentração e pureza do DNA plasmidial foram mensuradas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c -Thermo Scientific). A concentração do DNA plasmidial serviu de base para o cálculo do número de plasmídios. Para determinar a sensibilidade analítica da PCR em tempo real baseada na detecção pelo SYBR green foi confeccionada uma curva com sete pontos, plotando o número de cópias do plasmídeo pelos valores de C_T . O número de cópias variou de 3×10^6 a apenas três, e seis diluições separadas foram realizadas para cada ponto na curva. Uma curva de dissociação também foi adicionada ao final desse ensaio para verificar a especificidade e certificar a eficiência dos primers.

A especificidade da reação foi avaliada utilizando DNA de organismos relacionados e outros patógenos transmitidos por carrapatos, como: *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia canis*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

3.13 Sensibilidade e especificidade analítica da TaqMan-PCR para o diagnóstico de *Anaplasma phagocytophilum* em carrapatos

A sensibilidade da TaqMan-PCR foi determinada com descrito no item 3.12, com pequenas modificações. Uma curva foi confeccionada com seis pontos, cada um com seis diluições decimais seriadas, variando de 100.000 a 1 cópia do plasmídeo contendo um fragmento de 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum*. As reações foram realizadas com e sem a adição de 1µL de uma mistura equimolar de DNA de *A. cajennense* (carrapato mantido em laboratório) e capa leucocitária de um cão não infectado.

A especificidade da reação foi realizada conforme descrito no item 3.12.

3.14 Avaliação hematológica

Para avaliação hematológica, as amostras de sangue de cada cão foram colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e imediatamente armazenadas em ambiente contendo gelo (4°C) até o momento das análises em laboratório. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: volume globular (VG), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (He), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (ADH), número de plaquetas (PLA), volume plaquetário médio (VPM), leucometria global (LG), número de linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GRA) utilizando o contador automático de células (ABC VET, Horiba ABX), além de sólidos totais que foram determinados através de refratometria (COLES, 1984).

3.15 Avaliação parasitológica por esfregaço sanguíneo

Das amostras de sangue de cada cão foram feitos esfregaços sanguíneos, os quais foram identificados, secos em temperatura ambiente, fixados em álcool metílico puro para análise, durante 3 minutos. Em seguida foram corados pelo método de Giemsa (1:10) por 45 minutos em temperatura ambiente. Os esfregaços foram examinados em microscópio fotônico em objetiva de imersão (1000x), 200 campos por esfregaço.

3.16 Análise Estatística

Os resultados do diagnóstico pela PCR em tempo real em cães foram associados através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância com as variáveis obtidas através do questionário epidemiológico como: sexo, raça, idade, escore corporal, infestação por carrapatos, etc. Quando normais os valores médios dos parâmetros hematológicos foram submetidos a análise de variância e quando significativo as médias foram submetidas ao teste Tuckey em nível de 5% de significância. Quando os dados não apresentaram distribuição normal os valores de mediana dos parâmetros hematológicos obtidos de cães infectados e não infectados por *A. phagocytophilum* foram submetidos ao teste Mann-Whitney em nível de 5% de significância. A frequência das alterações hematológicas no grupo de cães infectados e não infectados 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 PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* em amostras de capa leucocitária obtidas de cães.

Das 398 amostras de capa leucocitária testadas pela PCR em tempo real, 24 (6,03%) apresentaram amplificação do fragmento de 122pb do gene *msp2*, específico para *A. phagocytophilum*. O valor médio de C_T observado nas amostras positivas foi de $32,94 \pm 2,34$ ciclos variando entre 26 e 35 ciclos. A temperatura de dissociação (T_m) dos produtos amplificados apresentou valor médio de $78,08 \pm 0,64^\circ\text{C}$, semelhante a do controle positivo (Figura 2). As amostras positivas na PCR em tempo real e submetidas à eletroforese em gel de agarose apresentaram bandas com o tamanho esperado de 122pb. Entre as amostras com C_T maior que 35 ciclos não foram observadas bandas, provavelmente em função da baixa concentração dos produtos amplificados.

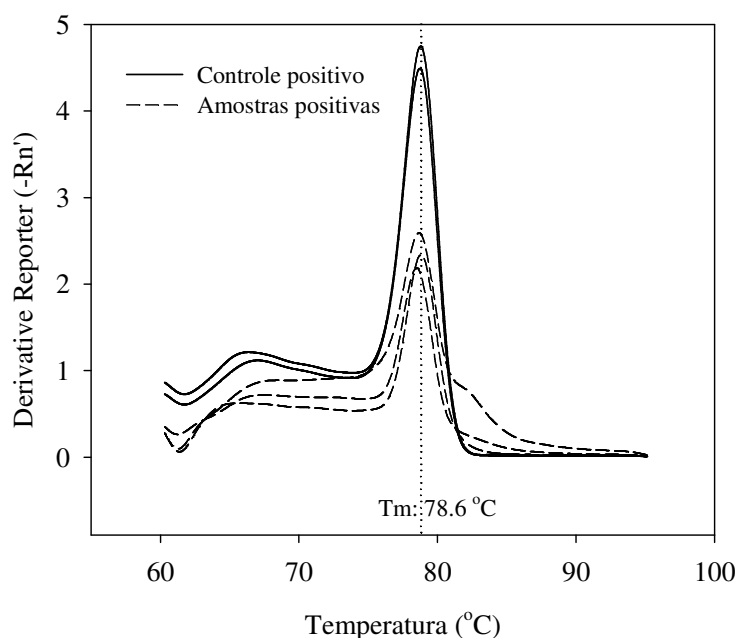


Figura 2. Curva de dissociação (*Melting Curve*) do fragmento de 122pb do gene *msp2* do controle positivo e das amostras de cães positivas mostrando a especificidade de amplificação de *Anaplasma phagocytophilum* pela PCR em tempo real.

Doze amostras positivas foram clonadas e seqüenciadas. Todas as seqüências apresentaram 100% de identidade entre si, então, uma única sequência foi depositada no banco de dados (GenBank) sob número de acesso HQ670750. A análise realizada utilizando a ferramenta BLASTn revelou identidade de 100% (122/122pb) para o gene *msp2* com as cepas de *A. phagocytophilum* isoladas do carrapato *Ixodes persulcatus* coletados na vegetação em áreas de mata no Japão (GenBank acesso FJ600612), de amostras de sangue de três cães que apresentavam sinais clínicos característicos de anaplasiose granulocítica e de dois ovinos da Suécia experimentalmente infectados com uma amostra criopreservada de *A. phagocytophilum* isolada de bovinos da Noruega com a febre do carrapato (GenBank acessos DQ519566 e DQ519565). A amostra seqüenciada no presente estudo também demonstrou

100% de identidade com outros isolados de *A. phagocytophilum* obtidos do sangue de equinos e humanos dos Estados Unidos (GenBank acessos AY763480 e P000235).

Usando um número conhecido de cópias do vetor-inserto, a sensibilidade analítica da técnica da PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR green foi avaliada. O limite de detecção da técnica foi de três cópias do plasmídeo contendo o gene *msp2* de *A. phagocytophilum*. O coeficiente de correlação de seis repetições das sete diluições testadas na curva padrão foi de 99%, com C_T variando de $15,15 \pm 0,17$ ciclos na primeira diluição (3×10^6 cópias do plasmídeo) até $33,91 \pm 1,07$ ciclos na última diluição (três cópias do plasmídeo) (Figura 3). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na sensibilidade analítica quando $1 \mu\text{L}$ de DNA da capa leucocitária de um cão não infectado foi adicionado na PCR. As curvas apresentaram a mesma inclinação durante a fase exponencial da amplificação demonstrando a eficiência da reação mesmo nos pontos com pouco alvo (Figura 4). Quando a especificidade da PCR em tempo real foi avaliada em relação a outras bactérias proximamente relacionadas somente o DNA de *A. phagocytophilum* produziu sinal fluorescente.

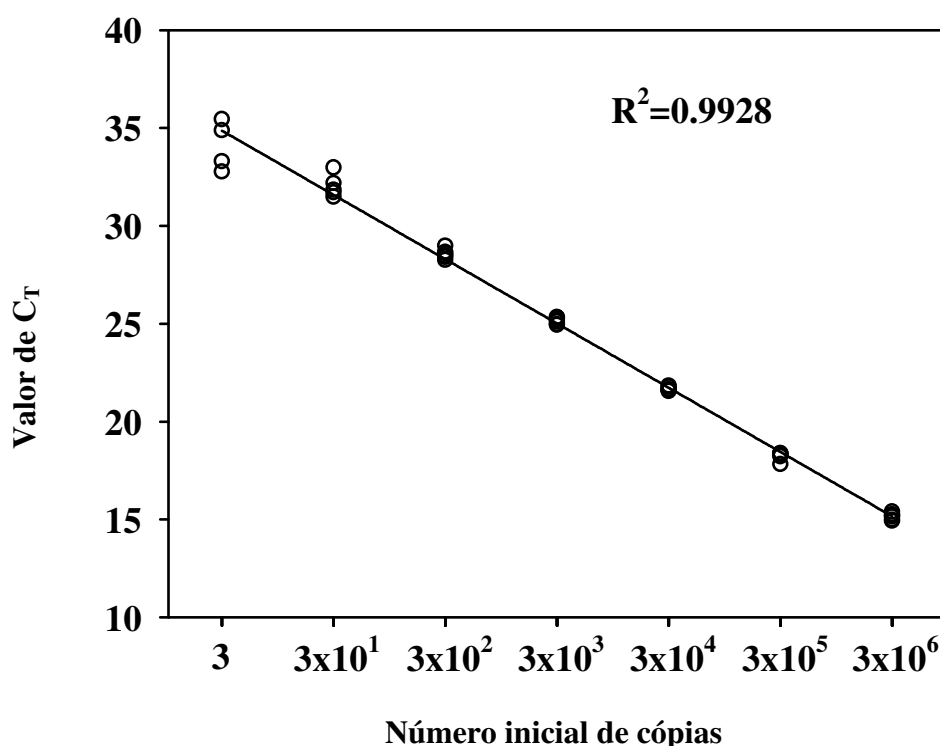


Figura 3. Curva padrão criada a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o fragmento de 122 pares de base do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*. O valor de C_T obtido pela PCR em tempo real foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo utilizando o sistema SYBR green.

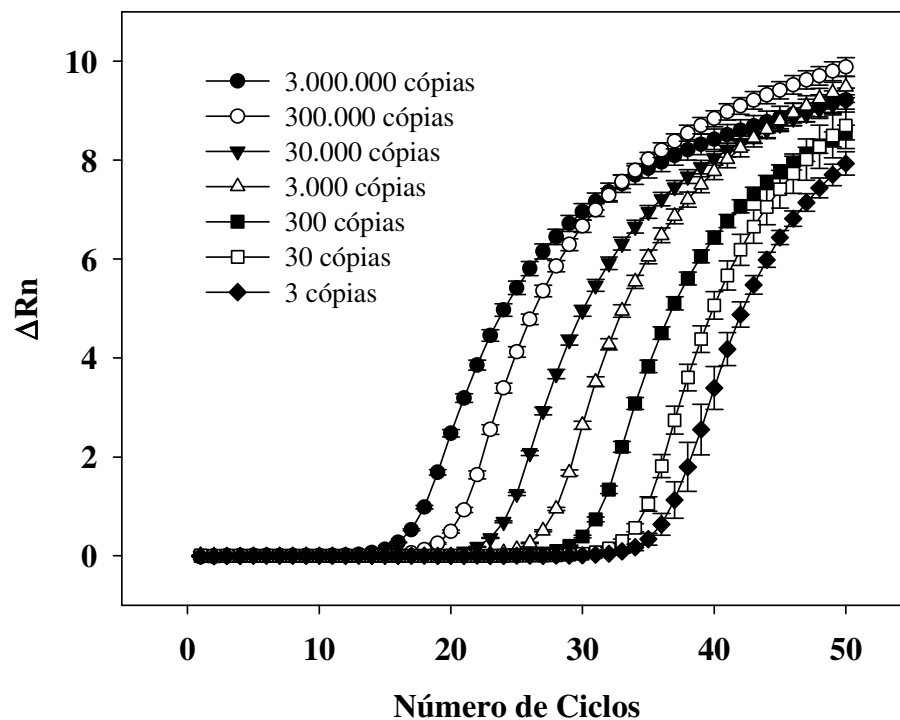


Figura 4. Sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando o SYBR Green para a detecção de amplificação. A curva mostra amplificação de diluições seriadas (3 – 3.000.000 cópias) do DNA plasmidial contendo o fragmento de 122 pares de base do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*.

4.2 PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* em carrapatos obtidos de cães

A técnica TaqMan-PCR foi utilizada para avaliar a presença de um fragmento de 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum* em 235 amostras de DNA total extraídos de carrapatos. A PCR foi realizada em 194 amostras de *R. sanguineus* (100 fêmeas, 82 machos e 12 “pools” de cinco ninfas), em 15 amostras de *A. cajennense* (nove fêmeas e seis machos), em oito amostras de *A. ovale* (cinco fêmeas e três machos) e em 18 ninfas de *Amblyomma* sp.

A frequência de carrapatos positivos para *A. phagocytophilum* pela TaqMan-PCR foi de 2,55% (n=6/235). Quando a positividade para *A. phagocytophilum* foi analisada em relação ao número de carrapatos da mesma espécie, observou-se que a maior frequência foi entre os carrapatos da espécie *A. cajennense*, com 6,67% (n=1/15) de carrapatos positivos contra 2,58% (n=5/194) para a espécie *R. sanguineus*. O exemplar infectado da espécie *A. cajennense* era fêmea. O DNA de *A. phagocytophilum* foi detectado em adultos de *R. sanguineus* com frequência de 7,76% (n=4/194) em machos e 0,51% (n=1/194) em fêmeas. (Figura 5). Todos os carrapatos positivos foram obtidos de cães domiciliados em áreas rurais da microrregião de Itaguaí. O valor médio dos C_T s obtidos das amostras positivas foi de $30,42 \pm 2,38$, variando entre 26,75 a 33,14 ciclos. O menor C_T (26,75 ciclos) foi obtido de uma fêmea de *A. cajennense* e o maior (33,14 ciclos) de uma fêmea de *R. sanguineus*.

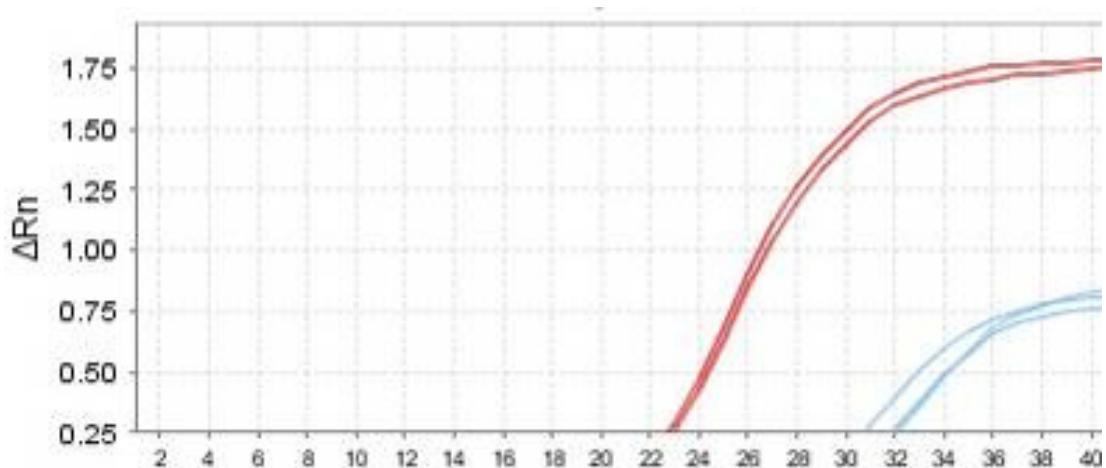


Figura 5. Curva de amplificação do fragmento de 122 pares de base do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum* em carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. As linhas vermelhas representam os controles positivos e as linhas azuis as amostras de carrapatos positivas.

A sensibilidade analítica da técnica TaqMan-PCR foi avaliada. O limite de detecção da técnica foi de uma cópia do plasmídeo contendo o gene *msp2* de *A. phagocytophilum*. O coeficiente de correlação de seis repetições das seis diluições testadas na curva padrão foi de 99,56%, com C_T variando de $19,66 \pm 0,07$ ciclos na primeira diluição (1×10^5 cópias do plasmídeo) até $37,06 \pm 0,59$ ciclos na última diluição (uma cópia do plasmídeo) (Figura 6). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na sensibilidade analítica quando $1 \mu\text{L}$ de uma mistura equimolar de DNA extraído da capa leucocitária de um cão não infectado e do carrapato *A. cajennense* foi adicionado na PCR. Sendo assim, independente da complexidade da amostra de DNA testada (presença de DNA genômico de diferentes organismos), a reação de PCR utilizando o sistema TaqMan permaneceu com a mesma eficiência. Os oligonucleotídeos iniciadores demonstraram alta eficiência, já que as curvas de amplificação apresentaram a mesma inclinação durante a fase exponencial da amplificação até mesmo nos pontos com um único alvo (Figura 7). A técnica TaqMan-PCR demonstrou alta especificidade quando o DNA de outras bactérias proximamente relacionadas a *A. phagocytophilum* foi adicionada na reação.

Três amostras positivas na PCR foram clonadas e sequenciadas, duas amostras foram isoladas de *R. sanguineus* e uma de *A. cajennense*. Um alinhamento múltiplo foi realizado utilizando a ferramenta BLAST, as sequências apresentaram 100% de identidade com as amostras isoladas de cães no presente estudo e com outras sequências depositadas no GenBank. Esse resultado confirma a presença de *A. phagocytophilum* em carrapatos no Brasil.

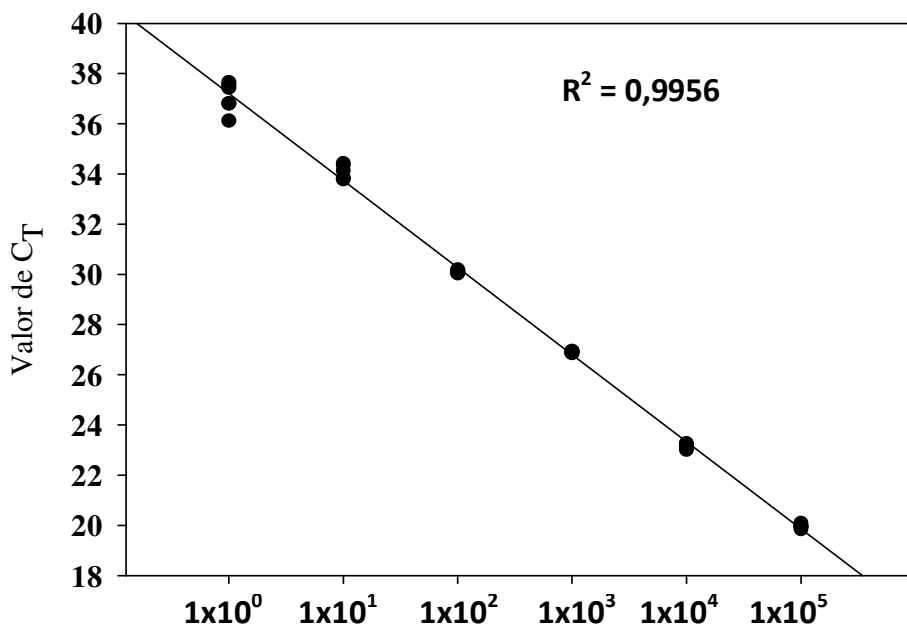


Figura 6. Curva padrão criada a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o fragmento de 122 pares de base do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*. O valor de C_T obtido pela TaqMan-PCR foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo.

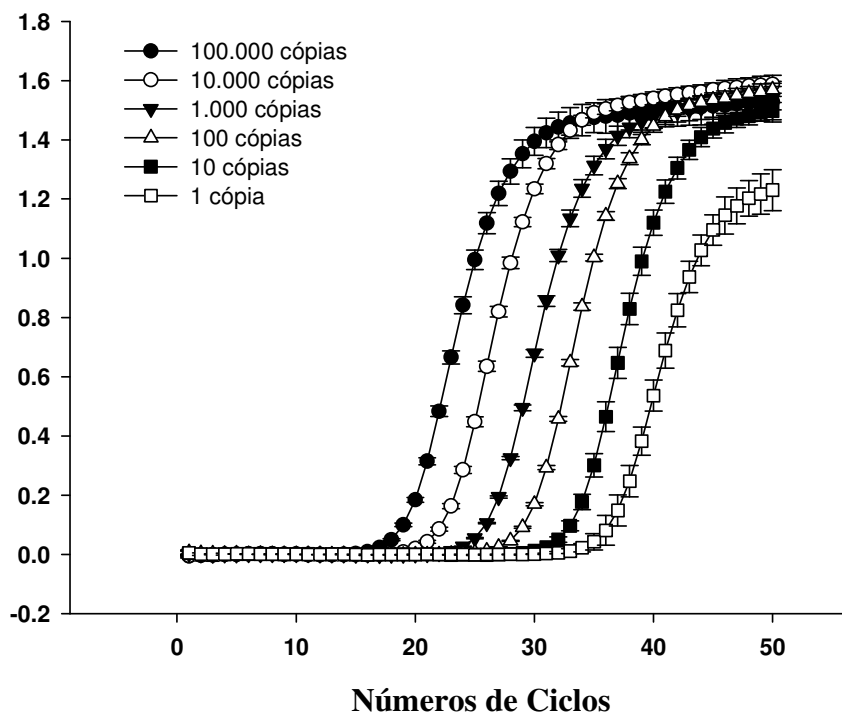


Figura 7. Sensibilidade analítica da TaqMan-PCR. A curva mostra amplificação de diluições seriadas (1 – 100.000 cópias) do DNA plasmidial contendo o fragmento de 122 pares de base do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum* isolado de carrapatos.

4.3 Fatores associados com o resultado positivo na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*

Com o objetivo de determinar possíveis fatores associados com o resultado positivo na PCR para *A. phagocytophilum* as informações obtidas por meio de questionário epidemiológico foram relacionadas com o resultado da PCR em tempo real para os cães.

4.3.1 Fatores associados às características do cão com a infecção por *Anaplasma phagocytophilum*

No presente estudo, não foi verificada associação ($p > 0,05$) entre as variáveis: sexo, raça, idade, comprimento do pêlo, porte do animal, escore corporal, histórico de doenças causadas por agentes etiológicos transmitidos por carrapatos e histórico de epistaxe, rinorragia e outros sinais de deficiência na coagulação com o resultado positivo na PCR em tempo real (Tabela 1). A única variável relacionada com o hospedeiro que apresentou associação ($p < 0,05$) com a positividade na PCR foi histórico de infestação por carrapatos. Todos os cães positivos na PCR ($n=24$) tinham histórico de infestação por carrapatos (Tabela 1).

Em relação ao sexo, observou-se um maior percentual de cães machos positivos na PCR quando comparado com as fêmeas com 7,21% ($n=15/208$) dos machos e 4,74% ($n=9/190$) das fêmeas positivas na PCR. A infecção por *A. phagocytophilum* foi mais frequente (10,62%, $n=10/113$) em cães com idade entre cinco e 10 anos, seguido de cães com faixa etária entre dois e cinco anos (5,47%, $n=7/128$), entre seis meses e dois anos (3,96%, $n=4/101$) e um (3,70%, $n=1/27$) cão com idade superior a 10 anos (5,55%). No presente estudo não foi observado cães positivos na PCR para *A. phagocytophilum* entre aqueles com faixa etária inferior a seis meses. Entre os cães positivos, 5,26% ($n=15/285$) não possuíam raça definida e 7,96% ($n=9/113$) tinham raça definida. As raças positivas para *A. phagocytophilum* foram: dois Labradores, dois Pinshers, um Poodle, um Rotweiller, um Fila, um Border Collie e um American Staffordshire.

Tabela 1. Frequência de cães positivos na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*, em função do sexo, raça, idade, tamanho do pêlo, porte do animal, escore corporal, histórico de infestações anteriores, histórico de doenças causadas por agentes transmitidos por carrapato e histórico de epistaxe, rinorragia etc.

Características dos cães	PCR em tempo real		Total
	Positivo	Negativo	
Sexo			
Fêmea	9 ^a	181	190
Macho	15 ^a	193	208
Total ($p = 0.4093$)	24	374	398
Definição racial			
Sem raça definida	15 ^a	270	285
Raça definida	9 ^a	104	113
Total ($p = 0.4311$)	24	374	398
Idade			
< 6 meses	0 ^a	29	29
≥ 6 meses até < 2 anos	4 ^a	97	101
≥ 2 até <5 anos	7 ^a	121	128
≥ 5 até 10 anos	12 ^a	101	113
≥ 10 anos	1 ^a	26	27
Total ($p = 0.1280$)	24	374	398
Tamanho do pêlo			
Curto	10 ^a	205	215
Médio	9 ^a	121	130
Longo	5 ^a	48	53
Total ($p = 0.1343$)	24	374	398
Porte do animal			

Pequeno	8 ^a	116	124
Médio	12 ^a	202	214
Grande	4 ^a	56	60
Total (p = 0.9281)	24	374	398
Escore corporal			
Magro	3 ^a	50	53
Normal	19 ^a	305	324
Obeso	2 ^a	19	21
Total (p = 0.8868)	24	374	398
Histórico de infestação por carrapatos			
Sim	24 ^a	308	332
Não	0 ^b	66	66
Total (p = 0.04)	24	374	398
Histórico de doenças causadas por agentes transmitidos por carrapato.			
Sim	1 ^a	41	42
Não	23 ^a	325	348
Não sabe dizer	0 ^a	8	8
Total (p=0.4261)	24	374	398
Histórico de epistaxe, rinorragia, etc...			
Sim	0 ^a	30	30
Não	24 ^a	344	368
Total (p=0.2964)	24	374	398

^aMédias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher (p>0,05).

4.3.2 Fatores associados ao ectoparasitismo em cães com a infecção por *Anaplasma phagocytophilum*

Do total de 398 cães avaliados, foi observado infestações por ectoparasitas (carrapatos, pulgas, piolhos e sarnas) em 309 (77,64%) cães no momento da coleta. Destes, 66,67% (n=206/398) apresentaram-se infestados por carrapatos, 61,49% (n=190) por pulgas, 4,85% (n=15) por sarnas e 2,27% (n=7) por piolhos (Figura 8a). Quanto ao grau de infestação por carrapatos, verificou-se que 54,37% (n=112/206) dos cães estavam infestados com menos de cinco carrapatos (infestação baixa), 28,15% (n=58/206) com cinco a 14 carrapatos (infestação moderada), 13,59% (n=28/206) com 15 a 29 carrapatos (infesção alta) e 3,88% (n=8/206) com mais de 30 carrapatos (infestação muito alta). Em relação infestação por carrapatos adultos, *R. sanguineus* foi encontrado em 82,52% (n=170/206) dos cães, *A. cajennense* em 20,39% (n=42/206), *A. ovale* em 3,40% (n=7/206) e *A. dubitatum* em 0,49% (n=1) dos cães infestados por carrapatos. Ninfas de *R. sanguineus* e *Amblyomma* sp foram observadas em 24,76% (n=51/206) e 15,53% (n=32/206) dos cães infestados por carrapatos, respectivamente(Figura 8b).

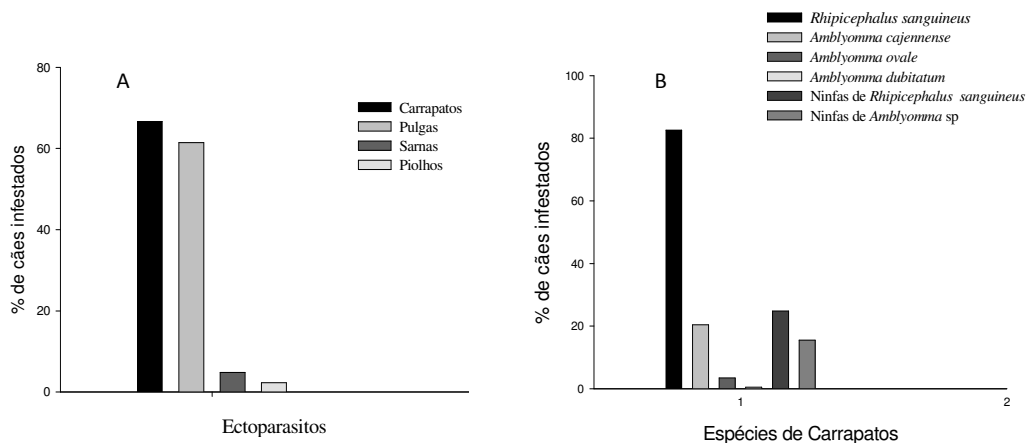


Figura 8. Ectoparasitismo em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. 8A. Percentual de cães infestados por ectoparasitas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. 8B. Fauna ixodológica em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Infestação por ectoparasitos foi observada em 79,16% (n=19/24) dos cães positivos na PCR em tempo real. Em 66,67% (n=16/24) dos cães positivos verificou-se a presença de carrapatos, no entanto a presença de carrapatos em cães no momento da coleta não teve associação (p=0,19) com a infecção por *A. phagocytophilum*. As espécies de carrapatos mais frequentes nos cães positivos foram *A. cajennense* (50%, n=12/24) e *R. sanguineus* (37,50%, n=9/24). Co-infestações por *A. cajennense* e *R. sanguineus* foram observadas em 20,83% (n=5/24) dos cães positivos. Avaliando a positividade para *A. phagocytophilum* em função da espécie de carrapato encontrada sobre os cães, observou-se que 28,57% (n=12/42) e 5,29% (n=9/170) estavam infestados com *A. cajennense* e *R. sanguineus*, respectivamente. Entre os cães infestados (n=206), uma associação significativa (p<0,01) foi observada entre a presença de *A. cajennense* e o resultado positivo na PCR (Figura 9).

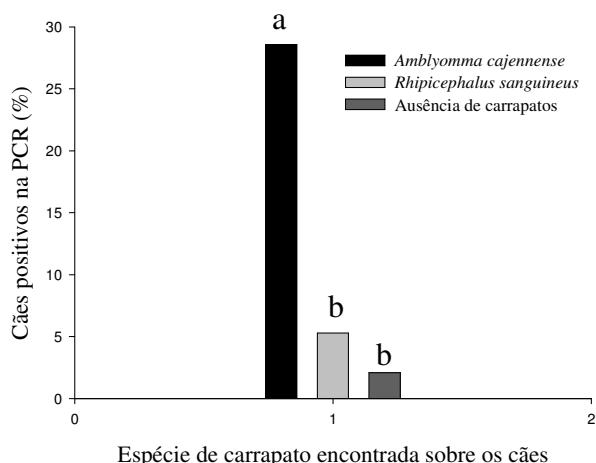


Figura 9. Percentual de cães positivos para *Anaplasma phagocytophilum* na PCR em tempo real em função da espécie de carrapato encontrada parasitando os cães.

^a Colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado em nível de 5% de confiança.

Quando o nível de infestação por carrapatos foi avaliado em função da positividade dos cães na PCR verificou-se uma frequência de 4,46% (n=5/112) naqueles cães com grau de infestação baixa, 5,17% (n=3/58), 10,71% (n=3/28) e 12,50% (n=1/8) nos cães com infestação moderada, alta e muito alta, respectivamente (Figura 10). Razão entre frequências

foi de 2,14 vezes maior entre cães com nível de infestação baixo em comparação com a frequência em cães não infestados; a razão entre frequência entre os cães com infestação moderada, quando comparados aos cães não infestados foi de 2,48 vezes maior; já quando se avalia a razão entre frequências de cães com nível de infestação alto frente a cães não infestados, a frequência foi 4,89 vezes maior e, por fim, quando se compara as frequências entre cães com infestação muito alta e cães não infestados, os primeiros apresentaram frequência 6,01 vezes maior. Embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas, é evidente que a frequência da infecção tende a aumentar conforme aumenta o nível de infestação dos animais, podendo ser caracterizado um fator de risco para a anaplasmoze granulocítica, como seria de se esperar. É importante salientar que o nível de infestação foi avaliado independentemente das espécies de carrapatos encontradas sobre os cães.

Dos 206 cães infestados por carrapatos, 144 (69,90%) pertenciam a domicílios localizados em áreas rurais e 62 (30,10%) a domicílios urbanos. Os carrapatos do gênero *Amblyomma* foram observados somente em cães domiciliados em áreas rurais da microrregião de Itaguaí. A frequência de cães infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma* em domicílios rurais foi de 56,94% (n=82/144) diferindo significativamente (p<0,05) da frequência observada em cães domiciliados em áreas urbanas. Os carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram encontrados em cães de áreas rurais e urbanas. Em áreas rurais a frequência de cães parasitados por *R. sanguineus* diferiu significativamente quando comparados com os cães domiciliados em áreas urbanas. O percentual de cães parasitados por *R. sanguineus* em domicílios rurais foi de 75,00% (n=108/144), enquanto que em domicílios urbanos esse percentual foi de 100% (n=62/62) (Figura 11). *Amblyomma* sp e *R. sanguineus* foram encontrados simultaneamente em 18,05% (n=26/144) dos cães domiciliados em áreas rurais da microrregião de Itaguaí.

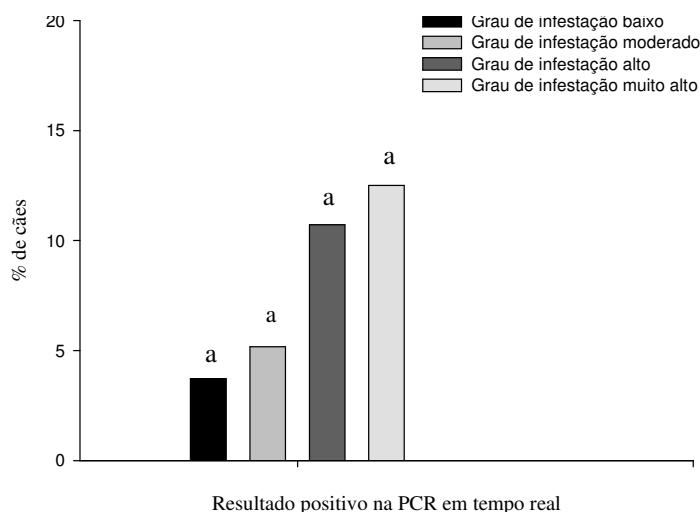


Figura 10. Nível de infestação por carrapatos em função da positividade na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* em cães domiciliados em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. Grau de infestação baixo (<cinco carrapatos), moderado (\geq cinco<15 carrapatos), alto (\geq 15<30 carrapatos) e muito alto (\geq 30 carrapatos).

^a Colunas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

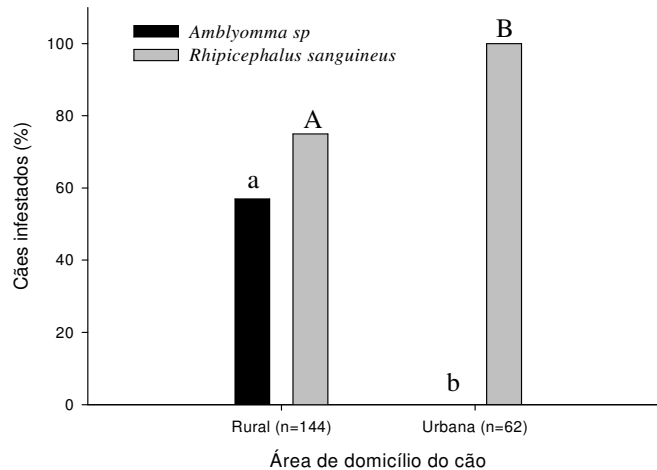


Figura 11. Frequência de cães parasitados em por carrapatos *Amblyomma sp* e *Rhipicephalus sanguineus* em áreas rurais e urbanas da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

4.3.3 Fatores associados ao comportamento e o hábito do cão com a infecção por *Anaplasma phagocytophilum*

No presente estudo as variáveis relacionadas com o comportamento e o hábito do animal como: animal vive dentro da residência, contato com outras espécies, tratamento carrapaticida, hábito do animal e ambiente que o animal passa maior parte do tempo não apresentaram associação significativa ($p > 0,05$) com a positividade para *A. phagocytophilum* na PCR em tempo real (Tabela 3). A variável “locais de acesso do animal” foi a única que apresentou associação com a infecção por *A. phagocytophilum*. Neste estudo observou-se que 18,75% ($n=9/48$) dos cães que tinham acesso a áreas de mata estavam infectados por *A. phagocytophilum*, enquanto que os cães que tinham acesso a áreas de pastagens e ambiente urbano/quintal apresentam um frequência de positividade na PCR de 4,10% ($n=8/195$) e 4,52% ($n=7/155$), respectivamente. A frequência de animais que vivem soltos foi de 69,10% ($n=275/398$) dentre os quais 5,45% ($n=15/275$) apresentaram positividade para *A. phagocytophilum* na PCR em tempo real. Em relação aos animais que vivem sempre preso (21,11%, $n=84/398$) e preso durante o dia e solto a noite (9,55%, $n=38/398$) observou-se uma frequência da infecção por *A. phagocytophilum* de 9,52% ($n=8/84$) e 2,63% ($n=1/38$), respectivamente. Apesar de não ter sido verificado uma associação significativa, a frequência de cães positivos (7,94%, $n= 17/214$) que mantinham contato com outras espécies animais foi maior quando comparado com cães que não mantinham contato (3,95%, $n=7/177$). As demais variáveis estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Frequência de cães positivos na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*, em função das características inerentes ao comportamento e o hábito do cão.

Variáveis	PCR em tempo real		Total
	Positivo	Negativo	
Animal vive dentro da residência			
Sim	6 ^a	41	47
Não	18 ^a	333	351
Total ($p = 0.3343$)	24	374	398
Locais de acesso do animal			
Ambiente urbano/ Quintal	7 ^a	148	155

Pastagem	8 ^a	187	195
Mata	9 ^b	39	48
Total (p=0.004)	24	374	398
Contato com outras espécies			
Sim	17 ^a	207	214
Não	7 ^a	177	184
Total (p = 0.1599)	24	374	398
Recebe Tratamento Carrapaticida			
Sim	17 ^a	271	288
Não	7 ^a	103	110
Total (p = 0.8687)	24	374	398
Hábito do animal			
Solto	15 ^a	260	275
Preso de dia e solto à noite	1 ^a	38	39
Sempre preso	8 ^a	76	84
Total (p = 0.2470)	24	374	398
Ambiente que o cão passa maior parte do tempo			
De terra e/ou cimento	15 ^a	245	260
Cimentado e/ou ladrilhado	8 ^a	94	102
Gramma e/ou pasto	1 ^a	35	36
Total (p = 0.5234)	24	374	398

^aMédias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (p>0,05).

4.3.4 Características das propriedades visitadas e sua associação com a presença de cães positivos para *Anaplasma phagocytophilum*.

Foram visitadas 145 residências e propriedades rurais na microrregião de Itaguaí, sendo 84 (57,93%) localizadas no município de Seropédica e 61 (42,07%) no município de Itaguaí. Na microrregião de Itaguaí (municípios de Seropédica e Itaguaí) foram visitadas 69 (47,59%) residências em áreas urbanas e 76 (52,41%) em propriedades rurais. No presente estudo observou-se que 11,85% (n=9/76) e 13,04% (n=9/69) dos domicílios rurais e urbanos, respectivamente, tinham cães positivos para *A. phagocytophilum*. Não houve associação entre a infecção por *A. phagocytophilum* com área de domicílio do cão (rural ou urbano). Em relação ao número de propriedades visitadas verificou-se que 12,41% (n=18/145) delas possuíam pelo menos um cão positivo para *A. phagocytophilum*. Quando o número de cães por residência foi avaliado em função do resultado positivo na PCR para *A. phagocytophilum* observou-se uma tendência de positividade maior naquelas residências ou propriedades rurais com três ou mais cães, no entanto, não houve associação entre a variável, número de cães por residência com a infecção por *A. phagocytophilum* (Tabela 3). Em relação ao tipo de vegetação no entorno da residência verificou-se que 25% (n=5/20) dos domicílios sem vegetação possuíam cães positivos, esse percentual foi 10,77% (n=7/65) para os domicílios com áreas de mata no entorno e 10% (n=6/60) para os domicílios com áreas de gramado e/ou pastagem. O baixo número avaliado de domicílios sem vegetação no entorno pode ter superestimado o percentual de positividade neste tipo de categoria. Em 25% (n=5/20) das propriedades visitadas com condição de limpeza ruim foi verificada a presença de cães positivo para *A. phagocytophilum*, esse percentual foi de 15,38% (n=10/65) e 5% (n=3/57) para as propriedades com condição de limpeza moderada e satisfatória, respectivamente. As variáveis, tipo de residência, nível de escolaridade dos proprietários, nível sócio econômico

das propriedades e assistência veterinária não apresentaram associação com a presença de cães positivos para *A. phagocytophilum* na residência ou propriedade rural (Tabela 3).

Tabela 3. Características das residências ou propriedade rurais localizadas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*.

CARACTERÍSTICAS DA PROPRIEDADE	Número (%)	Resultado na PCR em tempo real	
		Positivo (%)	Negativo (%)
Número de residências ou propriedades visitadas			
Rural (%)	52,41 (n=76)	11,85 ^a (n=9)	88,15 (n=67)
Urbano (%)	47,5 (n=69)	13,04 ^a (n=9)	88,96 (n=60)
Total (p=0.9736)	145	18	127
Número de cães por residência.			
1	31,10 (n=45)	11,11 ^a (n=5)	88,88 (n=40)
2 a 3	48,90 (n=71)	11,27 ^a (n=8)	88,73 (n=63)
>3	20,00 (n=29)	17,24 ^a (n=5)	82,76 (n=24)
Total (p=0.6779)	145	18	127
Tipo de Residência.			
Alvenaria	98,62 (n=143)	12,59 ^a (n=18)	87,41 (n=125)
Madeira	1,38 (n=2)	0 ^a (n=0)	1,38 (n=2)
Total (p=0.7664)	145	18	127
Tipo de vegetação no entorno da residência.			
Sem vegetação (cimentado)	13,79 (n=20)	25,00 ^a (n=5)	75,00 (n=15)
Pastagem/Gramado	41,38 (n=60)	10,00 ^a (n=6)	90,00 (n=54)
Mata	44,83 (n=65)	10,77 ^a (n=7)	89,23 (n=58)
Total (p=0.1829)	145	18	127
Nível de escolaridade dos proprietários.			
Ensino fundamental incompleto	32,41 (n=47)	8,51 ^a (n=4)	91,49 ^a (n=43)
Ensino fundamental completo	14,48 (n=21)	9,52 ^a (n=2)	90,48 (n=19)
Ensino médio incompleto	11,03 (n=16)	12,50 ^a (n=2)	87,50 (n=14)
Ensino médio completo	17,93 (n=26)	15,38 ^a (n=4)	84,62 (n=22)
Ensino superior	21,38 (n=31)	19,35 ^a (n=6)	80,65 (n=25)

Outros (não informou, nunca frequentou a escola)	2,76 (n=4)	0 (n=0)	100 (n=4)
Total (p=0.7044)	145	18	127
Nível sócio Econômico.			
Alto	5,52 (n=8)	12,50 ^a (n=1)	87,50 (n=7)
Médio	51,72 (n=75)	12,00 ^a (n=9)	88,00 (n=66)
Baixo	42,76 (n=62)	12,90 ^a (n=8)	87,10 (n=54)
Total (p=0.9873)	145	18	127
Condição de limpeza do local que o cão passa maior parte do tempo.			
Satisfatória	41,38 (n=60)	5,00 ^a (n=3)	95,00 (n=57)
Moderada	44,83 (n=65)	15,38 ^a (n=10)	84,62 (n=55)
Ruim	13,79 (n=20)	25,00 ^b (n=5)	75,00 (n=15)
Total (p=0.0390)	145	18	127
O cão tem assistência de um veterinário?			
Sim	42,07 (n=61)	14,75 ^a (n=9)	85,25 (n=52)
Não	57,93 (n=84)	10,71 ^a (n=9)	89,29 (n=75)
Total (p=0.6361)	145	18	127
Qual a frequência?			
Só quando fica doente	57,37 (n=35)	17,14 ^a (n=6)	82,86 (n=29)
A cada seis meses	36,06 (n=22)	13,63 ^a (n=3)	86,36 (n=19)
Pelo menos uma vez no ano	6,55 (n=4)	0,00 ^a (n=0)	100,00 (n=4)
Total (p=0.6463)	61	9	52

^aMédias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (p>0,05).

4.4 Análise hematológica

A avaliação dos valores hematológicos médios entre os animais positivos e negativos para *A. phagocytophilum* não diferiram significativamente (p>0,05) nos seguintes parâmetros: número médio de hemácias (HEM), concentração de hemoglobina plasmática (HB), volume globular (VG), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (ADH), número médio de plaquetas (PLAQ), volume plaquetário médio (VPM) e sólidos totais (Tabela 4).

Os únicos parâmetros hematológicos que apresentaram valores médios abaixo do limite de referência foram o volume globular e o número médio de plaquetas. Entre os cães positivos o volume globular e o número médio de plaquetas foram de 35,28% e 184.540 plaquetas/mm³, respectivamente. Entre os cães negativos na PCR esses valores foram de 35,05% para o volume globular e 197.050 plaquetas/mm³ para o número médio de plaquetas.

Tabela 4. Eritrograma e sólidos totais de cães positivos na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais*
						Mínimo	Máximo	
He (x10 ⁶ /mm ³)	Positivo	24	5,94 ^a	1,64	0,3	3,37	10	5,5 -8,5
	Negativo	374	5,61 ^a	1,44	0,1	0,98	10	
Hb (g/dL)	Positivo	24	13,88 ^a	3,75	0,8	7,6	21,6	12,0 - 18,0
	Negativo	374	12,80 ^a	3,42	0,2	2,9	25,0	
VG (%)	Positivo	24	35,28,0 ^a	7,43	2,1	20,0	52,3	37,0 - 55,0
	Negativo	374	35,05 ^a	8,97	0,6	13,7	54,8	
VCM (fm ³)	Positivo	24	64,25 ^a	4,59	1,1	57,0	72,0	60 – 77
	Negativo	374	62,08 ^a	5,98	0,3	43,0	80,0	
HCM (pg)	Positivo	24	23,68 ^a	3,67	0,4	8,2	27,6	22,0 - 27,0
	Negativo	374	22,79 ^a	2,75	0,2	13,8	29,9	
CHCM (g/dL)	Positivo	24	36,52 ^a	5,93	0,7	11,8	42,3	32,0 - 36,0
	Negativo	374	36,21 ^a	4,12	0,2	16,4	46,2	
ADH (%)	Positivo	24	15,67 ^a	1,76	0,5	13,5	19,7	14,0 – 17,0
	Negativo	374	15,66 ^a	1,97	0,6	4,9	24,4	
PLAQ (x10 ³ / mm ³)	Positivo	24	184,54 ^a	101,22	27,3	44,0	400,0	200 – 500
	Negativo	374	197,05 ^a	127,67	8,7	60,0	710,0	
MPV (fm ³)	Positivo	24	9,04 ^a	1,16	0,2	7,0	12,3	6,7 - 11,1
	Negativo	374	9,67 ^a	1,85	0,1	3,1	18,2	
Sólidos Totais (g/dL)	Positivo	24	7,50 ^a	1,08	0,3	5,8	9,8	6,0 - 8,0
	Negativo	374	7,69 ^a	1,36	0,1	4,4	12,8	

^a Quando os dados observados apresentaram distribuição normal as médias foram comparadas pelo teste F. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste F em nível de 5% de confiança. Quando os dados não apresentaram distribuição normal as medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney em nível de 5% de confiança. HEM: hemácias; HB: hemoglobina; VG: volume globular; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ADH: Amplitude de distribuição das hemácias; PLAQ: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. * Valores de referência segundo Weiss e Wardrop (2010).

Os grupos de cães positivos e negativos para *A. phagocytophilum* foram divididos em função de cada variável hematológica na tentativa de verificar a frequência das diferentes alterações hematológicas dentro de cada grupo. Em relação ao volume globular 54,17% (n=13/24) dos cães positivos apresentaram o volume globular abaixo dos valores de referência para a espécie, no entanto um percentual igualmente expressivo (57,75%, n=216/374) foi observado para os cães negativo na PCR. O número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina plasmática seguiram o mesmo comportamento do volume globular. O volume globular, o número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina plasmática não apresentaram associação significativa com a infecção por *A. phagocytophilum*. Quando o número de plaquetas foi avaliado em função da infecção por *A. phagocytophilum* observou-se uma frequência significativamente (p<0,05) superior de cães positivos com trombocitopenia quando comparados com os cães negativos. Entre os cães positivos 58,33% (n=14/24) apresentaram trombocitopenia, enquanto que no grupo de negativos o percentual de cães

trombocitopênicos foi de 32,35% (n=121/374) (Figura 12). É importante ressaltar que quando os valores médios do número de plaquetas nos dois grupos (positivo e negativos) foi avaliado não observou-se diferença estatística ($p>0,05$). Provalmente, esse fato pode estar relacionado com as trombocitopenias moderadas observadas no grupo de cães positivos.

A frequência nas alterações nos índices hematimétricos, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição das hemácias não diferiram entre os grupos de animais positivos e negativos na PCR em tempo real para *A. phagocytophilum* (Figura 13). Uma associação estatisticamente significativa ($p<0,05$) foi observada entre a infecção por *A. phagocytophilum* e o volume plaquetário médio. A frequência de cães com o volume plaquetário médio aumentado foi de 33,33% (n=8/24) no grupo de cães positivos e 15,24% (n=57/374) nos cães negativos. Cães com volume plaquetário diminuído só foram observados no grupo negativo para *A. phagocytophilum*.

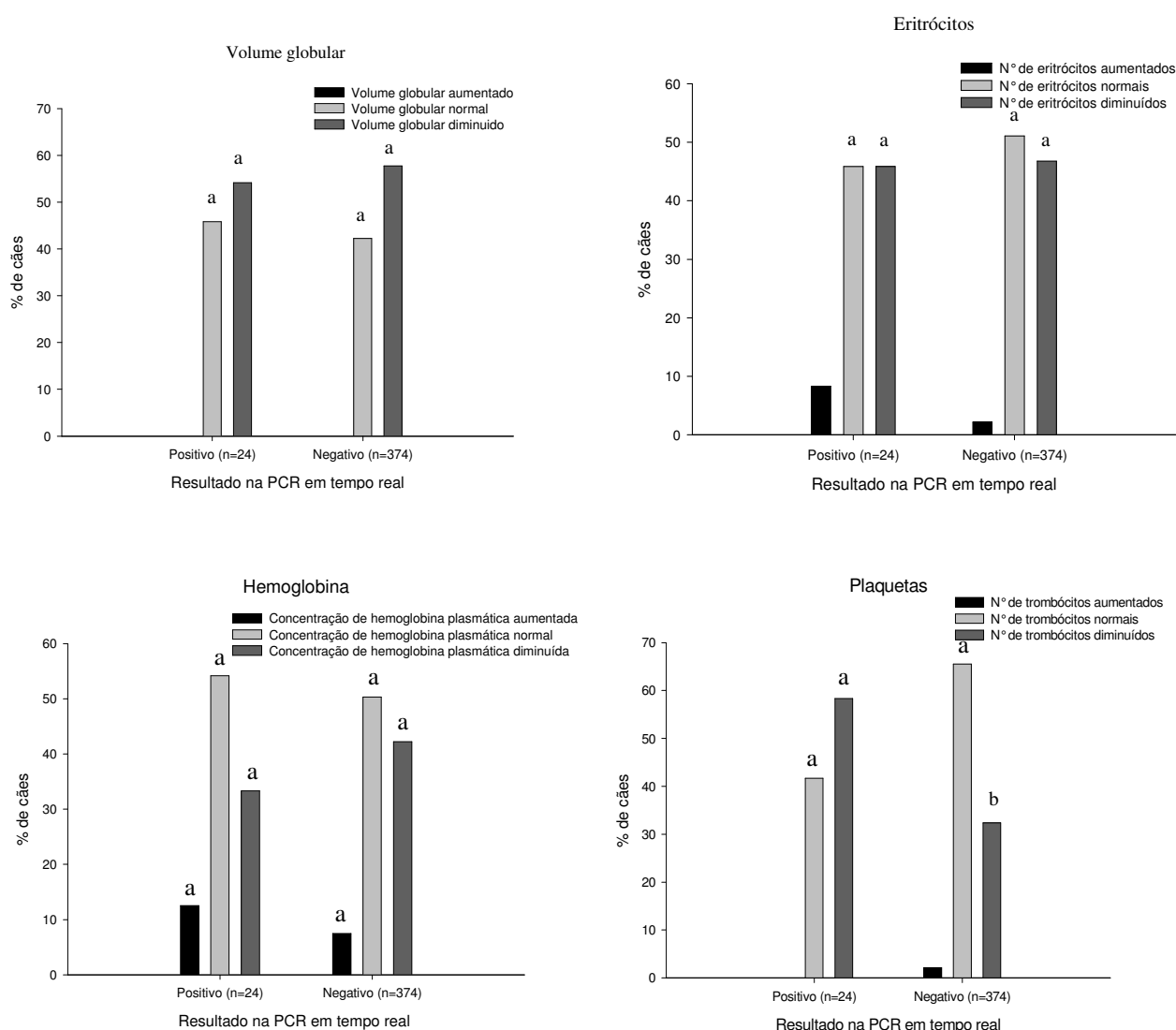


Figura 12. Frequência de cães com alterações no volume globular, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina plasmática e número de plaquetas em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*.

^a Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança

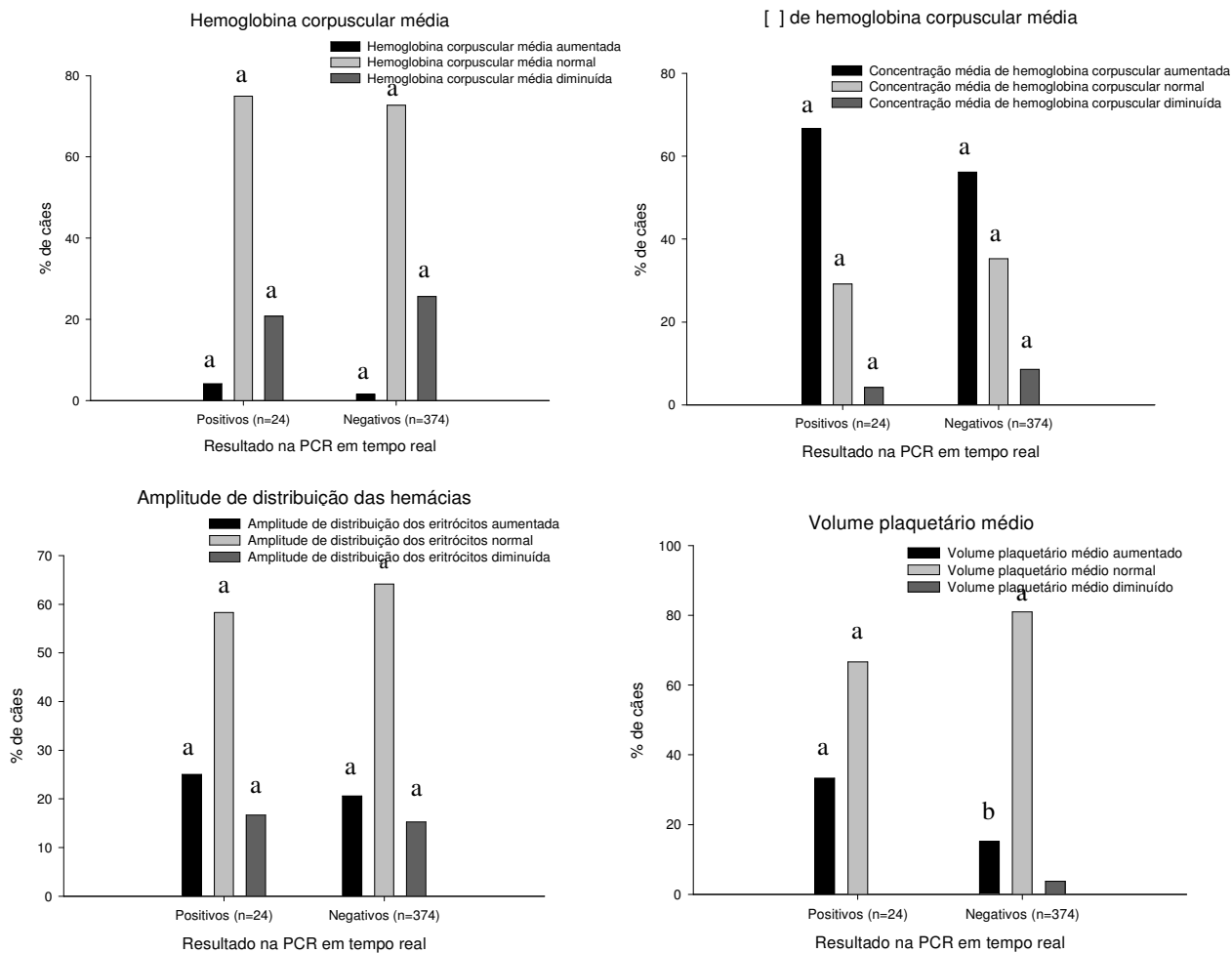


Figura 13. Frequência de cães com alterações nos índices hematimétricos (hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, amplitude de distribuição das hemácias e volume plaquetário médio) em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*.

^a Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança

Com relação à avaliação da série branca, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os animais positivos e negativos para *A. phagocytophilum* nos seguintes parâmetros médios: número de leucócitos (LEUC), número de linfócitos (LINF), número de monócitos (MON), número de neutrófilos (NEU) e número de eosinófilos (EOS) (Tabela 5). Todos os valores médios do leucograma apresentaram-se dentro do intervalo de referência para a espécie, tanto para os cães positivos quanto para os negativos.

Tabela 5. Leucograma de cães positivos na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais*
						Mínimo	Máximo	
LEUC (x10 ³ /mm ³)	Positivo	24	13,24 ^a	5,25	1,2	2,1	22,8	6,0 - 17,0
	Negativo	374	13,63 ^a	6,16	0,4	1,4	50,1	
LINF (x10 ³ /mm ³)	Positivo	24	2,71 ^a	1,88	0,38	0,21	8,69	1,0 - 4,8
	Negativo	374	3,15 ^a	2,35	0,12	0,08	12,55	
MON (x10 ³ /mm ³)	Positivo	24	0,77 ^a	0,55	0,11	0,12	1,85	0,15 - 1,35
	Negativo	374	0,79 ^a	0,68	0,03	0	4	
NEU (x10 ³ /mm ³)	Positivo	24	9,03 ^a	3,30	0,67	1,34	14,87	3,1 - 12,7
	Negativo	374	8,81 ^a	4,45	0,23	0,32	42,08	
EOS (x10 ³ /mm ³)	Positivo	24	0,73 ^a	1,22	0,05	0	5,93	0,1-1,25
	Negativo	374	0,88 ^a	1,06	0,06	0	8,65	

^a Quando os dados observados apresentaram distribuição normal as médias foram comparadas pelo teste F. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste F em nível de 5% de confiança. Quando os dados não apresentaram distribuição normal as medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney em nível de 5% de confiança. LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; NEU: Neutrófilos; EOS: Eosinófilos. N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. * Valores de referência segundo Weiss e Wardrop (2010).

Com relação a leucometria, a linfopenia foi o achado hematológico mais frequente entre os cães positivos na PCR para *A. phagocytophilum* quando comparado com o grupo de cães negativos, diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre os dois grupos (positivos e negativos). Observou-se uma frequência de linfopenia em 41,67% ($n=10/24$) dos cães positivos e 23,8% ($n=89/374$) entre os cães negativos. Não houve nenhum caso de linfocitose entre os cães positivos, já no grupo negativo a frequência foi de 3,21% ($n=12/374$).

Como demonstrado na figura 14 a frequência das alterações nos valores da leucometria global, número absoluto de neutrófilos, eosinófilos e monócitos não diferiram ($p > 0,05$) entre os cães infectados e não infectados por *A. phagocytophilum*. Monocitopenia foi verificada em 8,33% ($n=2/24$) e 7,22% ($n=27/374$) dos cães positivos e negativos, respectivamente, enquanto que a monocitose foi observada em 4,17% ($n=1/24$) dos positivos e 6,15% ($n=23/374$) entre os cães negativos. Entre os cães positivos um número de neutrófilos acima da normalidade foi observado em 41,67% ($n=10/24$) e um número abaixo dos valores de referência foi verificado em 4,17% ($n=1/24$). Uma frequência de 40,37% ($n=151/374$) foi observada para os cães negativos com número de neutrófilos aumentados e 2,94% ($n=11/374$) para os cães com número reduzido de neutrófilos.

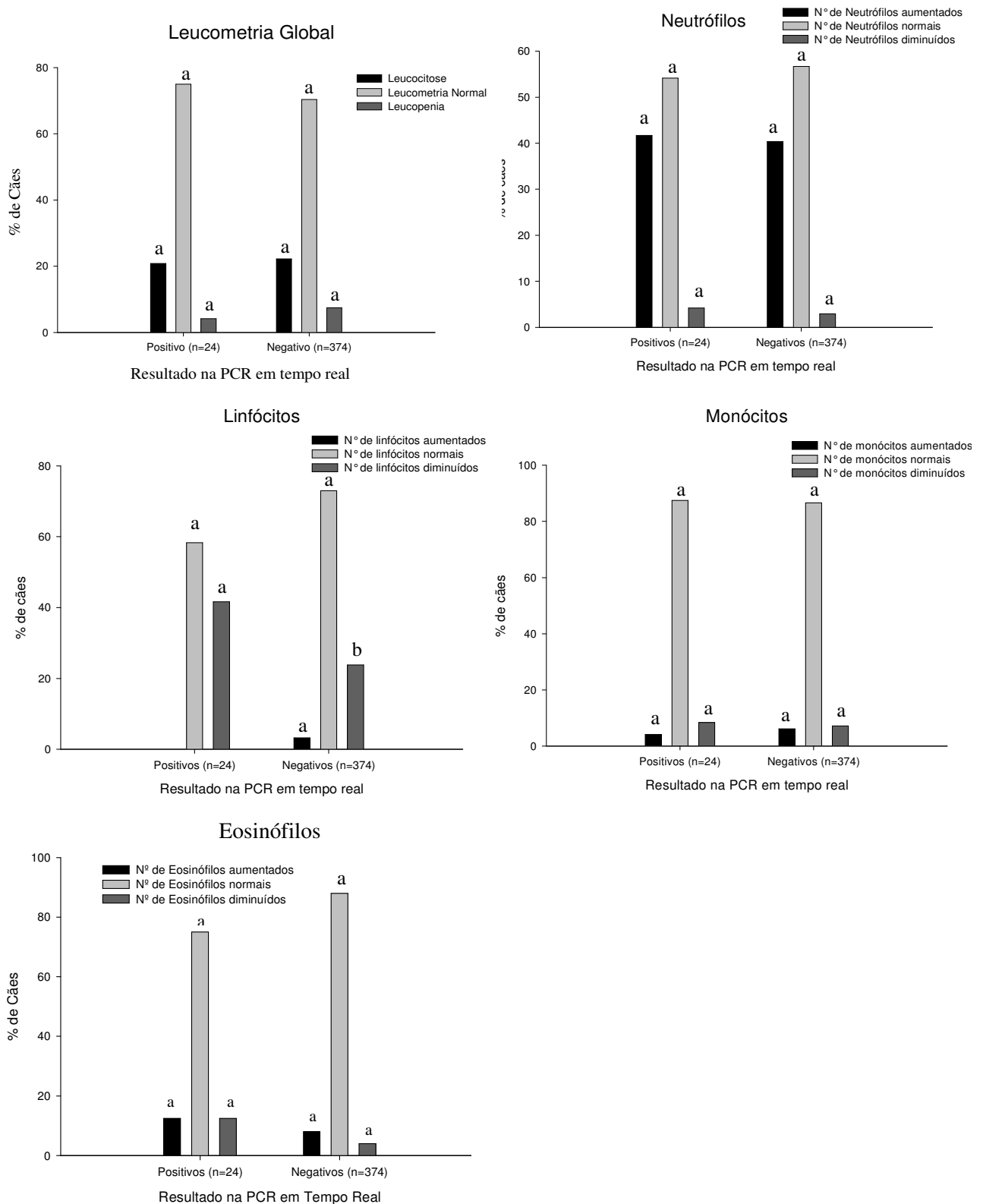


Figura 14. Frequência de cães com alterações na leucometria global, número absoluto de linfócitos, monócitos e granulócitos em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*.

^a Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança

4.5 Avaliação hemoparasitológica por esfregaço sanguíneo

Ao exame microscópico do esfregaço de sangue dos 398 cães da microrregião de Itaguaí observou-se maior frequência de infecção por *Anaplasma* spp, com 5,28% (n=21) dos cães parasitados, seguidos por *Hepatozoon* spp (2,26%, n=9/398), *Babesia* spp (1,26%, n=3/398), *Ehrlichia* spp (1,26%, n=3/398) e *Dirofilaria immitis* (0,25%, n=1/398) (Figuras 15, 16, 17 e 18). Dentre os cães avaliados, três apresentaram co-infecções, 0,25% (n=1/398) estavam co-infectado por *Anaplasma* spp/ *Ehrlichia* spp, 0,25% (n=1/398) por *Ehrlichia* spp/*Hepatozoon* spp e 0,25% (n=1/398) por *Anaplasma* spp/*Babesia* spp/*Ehrlichia* spp (Tabela 6). Não foi observada inclusão sugestiva de *A. phagocytophilum* em neutrófilos nas amostras avaliadas.

Entre as três amostras positivas no esfregaço sanguíneo para *Babesia* sp uma foi positiva na PCR para *A. phagocytophilum*. Em relação as 21 amostras de sangue de cão positivos no esfregaço sanguíneo para *Anaplasma* sp apenas uma amostra foi positiva na PCR para *A. phagocytophilum*.

Tabela 6. Frequência de hemoparasitos diagnosticados através da técnica de esfregaço sanguíneo em cães, naturalmente infectados, domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ.

Parasitos	Positivo	Negativo	Total
<i>Anaplasma</i> spp	5,28% (n=21)	94,72% (n=377)	398
<i>Ehrlichia</i> spp	1,26% (n=5)	98,74% (n=393)	398
<i>Babesia</i> spp	1,26% (n=3)	98,74% (n=393)	398
<i>Hepatozoon</i> spp	2,26% (n=9)	97,74% (n=391)	398
<i>Dirofilaria immitis</i>	0,25% (n=1)	99,75% (n=397)	398
<i>Anaplasma</i> spp/ <i>Ehrlichia</i> spp	0,25% (n=1)	99,75% (n=397)	398
<i>Ehrlichia</i> spp/ <i>Hepatozoon</i> spp	0,25% (n=1)	99,75% (n=397)	398
<i>Ehrlichia</i> spp/ <i>Anaplasma</i> spp/ <i>Hepatozoon</i> spp	0,25% (n=1)	99,75% (n=397)	398

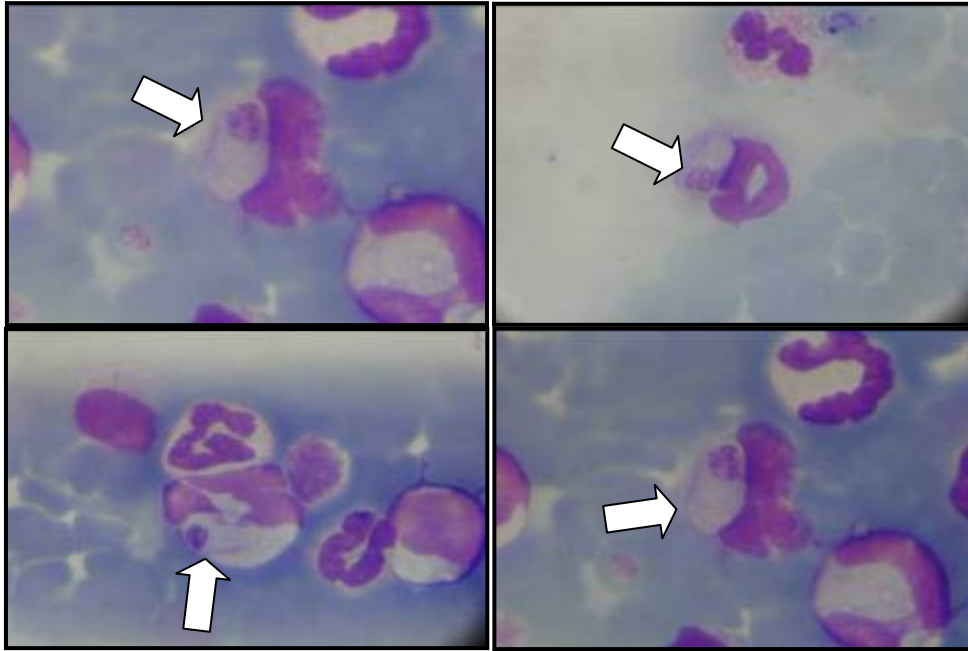


Figura 15: Gametócitos de *Hepatozoon* spp em neutrófilos visualizado em esfregaço sanguíneo, através de microscopia ótica, de cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí-RJ (1000X).

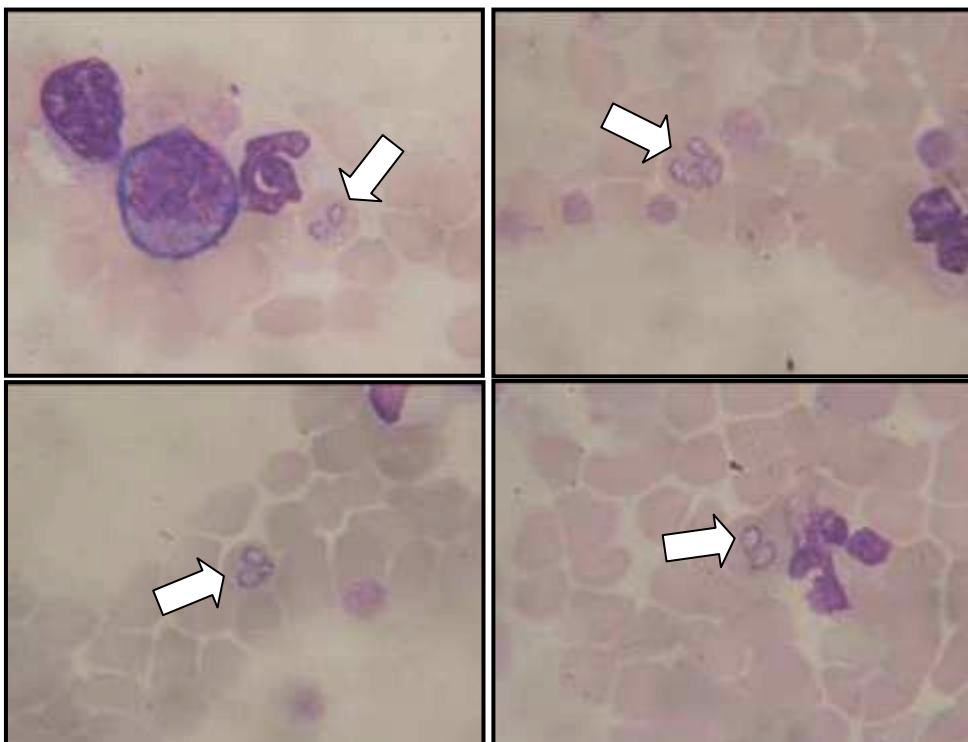


Figura 16: Trofozoítos de *Babesia* spp infectando hemácias visualizados em esfregaço sanguíneo, através de microscopia ótica em cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ (1000X).

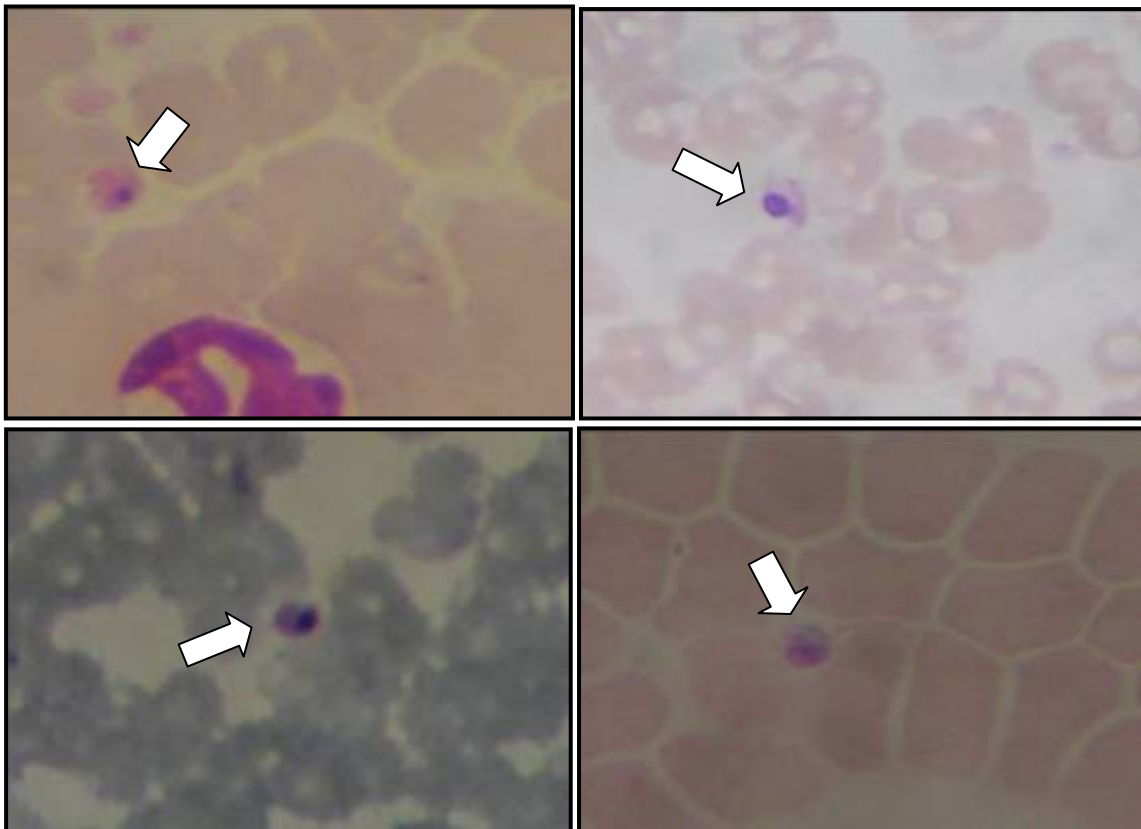


Figura 17: Corpúsculo de inclusão de *Anaplasma* spp em plaquetas, visualizado em esfregaço sanguíneo, em cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ (1000X).

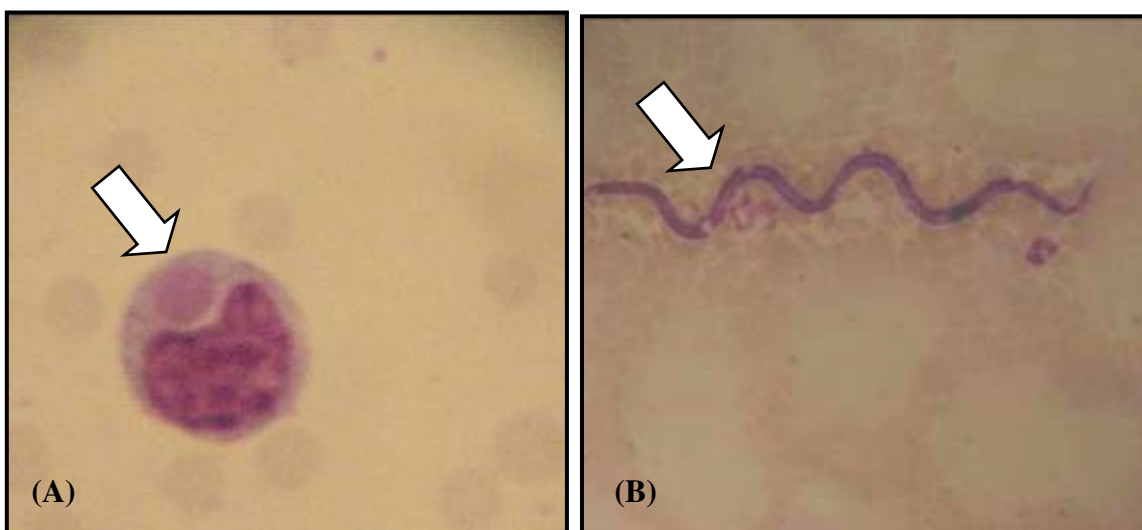


Figura 18: *Ehrlichia* spp em monócitos (A) e *Dirofilaria immitis*. (B) visualizados em esfregaço sanguíneo, em cães domiciliados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, RJ (1000X).

5. DISCUSSÃO

5.1 PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, a ocorrência de *A. phagocytophilum* no Brasil, diagnosticado em cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. Os resultados do presente estudo demonstram que o agente de uma zoonose responsável pela anaplasmosse granculocítica humana circula no território brasileiro. Em alguns países da Europa e nos Estados Unidos esse agente provoca severos danos a saúde humana, principalmente quando associados a outros organismos, tais como *B. burgdorferi*, tendo em vista que *A. phagocytophilum* infecta células (monócitos e neutrófilos) responsáveis pela reposta imunológica, o que debilita o organismo e favorece a multiplicação de microrganismos altamente patogênicos (NYARKO et al., 2006). Beall et al. (2008) verificaram que cães soropositivos para *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* foram quase duas vezes mais propensos a apresentar sinais clínicos compatíveis com a anaplasmosse e/ou borreliose, quando comparados aos cães que foram soropositivos para apenas um desses organismos. Além disso, cães com suspeita de anaplasmosse e/ou borreliose foram mais propensos a serem positivos na PCR quando comparados com cães saudáveis. Este resultado parece ser consistente com estudos anteriores demonstrando que a infecção com *A. phagocytophilum* na presença de outros patógenos altera a imunopatogênese e tornar as manifestações clínicas mais graves (MUNRO et al., 1982). Os resultados do presente trabalho é um alerta as autoridades em saúde pública, pois a região estudada pode ser considerada de risco para casos da Anaplasmosse Granculocítica em humanos, devendo este microrganismo ser considerado no diagnóstico diferencial de outras doenças causadas por rickettsias.

A presença de anticorpos da classe IgG contra *A. phagocytophilum* já foi detectado em equinos no Brasil (SALVAGNI et al., 2010; SANTOS, 2011), no entanto, o diagnóstico molecular desta rickettsia até o momento ainda não havia sido realizado, apesar de tentativas já terem sido efetuadas (DE PAIVA DINIZ et al., 2007; DAGNONE et al., 2009; SALVAGNI et al. 2010). Tal fato pode ser atribuído estação do ano no qual a pesquisa foi realizada ou a baixa sensibilidade das técnicas moleculares (nPCR) utilizadas nestes estudos.

A capacidade de detectar e identificar as moléculas de ácido nucléico de microrganismos, principalmente através da PCR, criou um poderoso e rápido meio para a detecção de bactérias difíceis de serem isoladas através do cultivo celular em laboratórios, como é o caso de *A. phagocytophilum*. Um significativo avanço na tecnologia da PCR foi o desenvolvimento de técnicas de detecção precisa de fragmentos de DNA em tempo real. Esta técnica apresenta várias vantagens sobre a PCR convencional, incluindo a velocidade, simplicidade, sensibilidade, reprodutibilidade, capacidade quantitativa e o baixo risco de contaminação (FENOLLAR; RAOULT, 2004). A técnica de PCR em tempo real utilizando SYBR green tem sido utilizada no diagnóstico de hemoparasitos (MATSUU et al., 2005). A maior sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando o gene *msp2* é provavelmente devido ao uso do reagente SYBR Green PCR Master Mix, que é mais eficiente na amplificação e detecção de ácidos nucléicos. Ensaio de PCR em tempo real utilizando o corante SYBR green pode aumentar o limite de detecção em até 100 vezes quando comparado com o gel de agarose corado com brometo de etídio (DRAZENOVICH et al. 2002) um método tradicionalmente utilizado para a detecção dos produtos amplificados em uma PCR convencional.

O presente trabalho padronizou uma técnica de PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR green baseado em oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos por Drazenovich et al. (2006) para detecção do gene *msp2*, específico de *A. phagocytophilum*. A escolha do alvo foi baseada na especificidade dos primers para o gene *msp2* no diagnóstico de

A. phagocytophilum, já que os primers para o gene 16S RNA podem detectar outras espécies do gênero *Anaplasma* (EGENVALL et al., 2000b), inclusive *A. platys*, um organismo comum no Brasil que infecta plaquetas de cães. O uso do gene *msp2* aumenta a especificidade da reação de PCR por que não estar presente em bactérias distantemente relacionadas e tem se mostrado um excelente alvo utilizado em reações de PCR (MASSUNG et al., 2003). Além disso, ensaios de PCR em tempo real com alvo no gene 16S rRNA, apesar de específicos, perdem em sensibilidade quando comparado com o gene *msp2* (DRAZENOVICH et al., 2006). Uma provável razão para excelente sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando o gene *msp2* é que os primers podem amplificar as múltiplas cópias do gene *msp2* no genoma de *A. phagocytophilum* (MASSUNG et al. 2003). Os iniciadores utilizados neste estudo apresentaram alta sensibilidade a diferentes cepas de *A. phagocytophilum*, incluindo cepas do Centro-Oeste dos Estados Unidos, Europa, China e Guatemala como demonstrado por Drazenovich et al. (2006). Por esse motivo, os oligonucleotídeos iniciadores mencionados acima foram utilizados no presente estudo já que podem ser muito úteis em investigações da anaplasmose granulocítica em regiões onde o organismo é provável de ocorrer. Drazenovich et al. (2006) avaliaram 97 cães pela PCR em tempo real com alvo no gene 16S rRNA e nenhum cão foi considerado positivo, mas quando o gene *msp2* foi o alvo sete cães foram considerados positivos.

A PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR green desenvolvido neste estudo mostrou elevada sensibilidade e reprodutibilidade no diagnóstico de *A. phagocytophilum* em cães (Figura 2). A parasitemia por esta rickettsia em cães mostrou ser muito baixa, o que pode explicar os valores relativamente elevados de C_T observados. Provavelmente por esse motivo, outros estudos realizados no Brasil utilizando técnicas de PCR convencional, como o Nested PCR, não obtiveram êxito no diagnóstico desse parasito em cães (DE PAIVA DINIZ et al., 2007; DAGNONE et al., 2009). Outras abordagens para o diagnóstico da anaplasmose são muitas vezes inviável. O isolamento em meio de cultivo celular falta sensibilidade, porque a bactéria é fastidiosa e cresce lentamente nas células, enquanto a sorologia (RIFI e Western Blot) indica apenas exposição prévia e não uma infecção ativa (GOODMAN et al. 1996). Além disso, a reação cruzada na sorologia é um importante problema a ser considerado (BAKKEN et al. 1996a).

Neste estudo foram sequenciados 122pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum*. As sequencias obtida no presente estudo apresentaram 100% de identidade com outros isolados de *A. phagocytophilum* da Ásia, Europa e América do Norte, confirmando a presença deste agente em cães no Brasil. Segundo Courtney et al. (2004) devido a alta sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR baseados no gene *msp2* as sequencias obtidas podem não ser úteis para distinguir cepas proximamente relacionadas. No presente estudo, todas as amostras sequenciadas apresentaram 100% de identidade entre si, esse resultado é facilmente explicado já que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho flanqueiam uma região altamente conservada do gene *msp2* (BRAYTON et al. 2001). Estudos estão sendo conduzidos com objetivo de sequenciar uma porção maior do gene *msp2* das amostras positivas e testar sua homologia frente a outros isolados, cujo as sequências estão depositadas no GenBank.

Estudos que visam o sequenciamento de amostras regionais e nacionais de *A. phagocytophilum* serão de extrema relevância não só para a confirmação do diagnóstico definitivo, mas também para a caracterização genotípica dos diferentes isolados brasileiros. A caracterização de isolados em diferentes regiões do Brasil permitirá o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores baseados em sequências nativas, o que possibilitará a padronização de técnicas moleculares direcionadas para as variantes genéticas brasileiras. Aliado a isso, estudos de caracterização de genes codificadores de proteínas imunogênicas de

isolados brasileiros de *A. phagocytophilum*, permitirá o desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico a partir do antígeno nativo.

5.3 PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum* em carrapatos obtidos de cães

Este é o primeiro relato da infecção por *A. phagocytophilum* nos carrapatos adultos das espécies *R. sanguineus* e *A. cajennense* no Brasil. No presente estudo, apesar de todas as evidências epidemiológicas apontarem os carrapatos do gênero *Amblyomma* como os possíveis vetores de *A. phagocytophilum*, um maior número absoluto de carrapatos positivos foram da espécie *R. sanguineus*. Provavelmente, esse resultado esteja associado ao pequeno número de carrapatos do gênero *Amblyomma* analisados na PCR. *A. phagocytophilum* também foi detectado pela PCR em *R. sanguineus* na Itália com frequência de 0,09% (SATTA et al. 2010), taxa inferior a observada neste trabalho (2,58%). Não foi encontrado na literatura relato da infecção por *A. phagocytophilum* em *A. cajennense*. O único relato de infecção por *A. phagocytophilum* em carrapatos do gênero *Amblyomma* foi descrito por Nowak et al. (2010) na Polônia em *Amblyomma flavomaculatum* coletado em lagartos importados da África.

Todos os carrapatos positivos foram oriundos de cães negativos pela PCR em tempo real domiciliados em áreas rurais da região estudada, sugerindo que a infecção possa ter sido adquirida nos estágios de ninfa e/ou larva em outro hospedeiro. Provavelmente, os carrapatos adquiriram a infecção em hospedeiros silvestres, já que os domicílios dos cães de onde os carrapatos foram retirados eram cercados por áreas de mata, onde foi constatada a presença de animais silvestres (gambá e roedores).

Até o momento é desconhecido se *A. phagocytophilum*, como em outros agentes transmitidos por carrapatos, é mantido em carrapatos através de transmissão transovariana (TELFORD et al., 1996). Um estudo longitudinal de dois anos realizado em áreas de mata no Nordeste da Inglaterra indicou uma variação sazonal da infecção em roedores, a qual parece estar associada com o aumento sazonal na abundância de ninfas e adultos de *Ixodes trianguliceps*, mas não de larvas (BOWN et al., 2003). Segundo Bown et al. (2003) os carrapatos são os principais reservatórios de *A. phagocytophilum* já que a grande maioria dos hospedeiros vertebrados tem um período de bacteremia relativamente curto.

Nesta pesquisa, a taxa de infecção em machos de *R. sanguineus* foi maior do que em fêmeas, resultado também observado por Cao et al. (2006) que atribuíram esse fato às variações geográficas e sazonais de carrapatos infectados ou a diferentes abordagens no momento da amostragem. No entanto, Tomasiewicz et al. (2004) em estudo realizado na Polônia observaram um maior número de carrapatos fêmeas positivos para *A. phagocytophilum* (45,7%, n=79/173), quando comparado com os carrapatos machos (4,5%, n=9/202) e ninfas (0,9%, n=3/319). Futuros estudos utilizando um maior número de carrapatos em diferentes estações do ano, localidades e habitats são necessários para a compreensão das taxas de infecções nos carrapatos.

Discrepantes taxas de infecção de *A. phagocytophilum* em carrapatos foram observadas em todo mundo. A prevalência de *A. phagocytophilum* em *I. persulcatus* na Coreia (KIM et al. 2003) foi menor que em *I. persulcatus* e *I. ovatus* no Japão (OHASHI et al. 2005). Taxas de infecções inferiores a 1% foram observadas em adultos de *I. pacificus* na Califórnia (BARLOUGH et al. 1997b), adultos de *I. ricinus* no Reino Unido (GUY et al. 1998) e Suíça (PUSTERLA et al. 1999a) e em *Dermacentor silvarum* na província de Jilin na China (CAO et al. 2006). Prevalências mais elevadas foram relatadas em *I. scapularis* nos Estados Unidos (PANCHOLI et al. 1996), *I. ricinus* na Holanda (SCHOULS et al. 1999) e Suécia (VON et al. 1997) e *I. persulcatus* na China (CAO et al. 2006).

Como nos cães, a infecção por *A. phagocytophilum* em carrapatos foi muito baixa como demonstrado pelos elevados valores de C_T observados. O valor de C_T é diretamente proporcional à quantidade de amostra inicial e é a base para calcular o número de cópias de DNA alvo. Neste ponto todas as amostras podem ser comparadas, além de permitir a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência (GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A técnica de TaqMan-PCR utilizada no presente estudo para o diagnóstico de *A. phagocytophilum* em carrapatos foi capaz de detectar uma única cópia do gene *msp2*, o que demonstra sua elevada sensibilidade para o diagnóstico de *A. phagocytophilum* em amostras de DNA de carrapatos. Provavelmente, um dos motivos da alta sensibilidade demonstrada pela técnica TaqMan-PCR esteja relacionada a alta qualidade do DNA obtido das amostras de carrapato, associado com a alta sensibilidade conferida por este sistema de detecção específica de ácidos nucleicos. Neste trabalho, a pureza do DNA total de carrapatos foi sempre superior a dois.

Além da elevada sensibilidade apresentada, a técnica TaqMan-PCR é mais específica do que as outras modalidades de PCR, já que, além dos primers, utiliza uma “sonda”. As sondas Taq Man[®] são utilizadas para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR (GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996). Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher*. 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 iniciadores, é necessário que a sonda hibridize no fragmento a ser amplificado.

5.3 Fatores associados com o resultado positivo na PCR em tempo real para *Anaplasma phagocytophilum*

5.3.1 Fatores associados às características do cão e do domicílio com a infecção por *Anaplasma phagocytophilum*

Na literatura poucos estudos de base populacional têm sido conduzidos com o objetivo de estudar os fatores envolvidos com a dinâmica de transmissão de *A. phagocytophilum* em cães, apesar do grande número de estudos envolvendo soroprevalência desse agente: Alemanha (BARUTZKI, 2006), Itália (TORINA; CARACAPPA, 2006; EBANI et al., 2008), Polônia (SKOTARCZAK et al., 2004;), Portugal (SANTOS et al., 2009a), Austria (KIRTZ et al., 2007), Suécia (EGENVALL et al., 2000a; JÄDERLUND et al., 2007), Suíça (PUSTERLA et al., 1998), Israel (LEVI et al., 2006), Espanha (AMUSATEGUI et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2006) e Estados Unidos (SUKSAWAT et al. 2000; BOWMAN et al., 2009). A grande maioria dos estudos são do tipo relato de caso (EGENVALL et al., 1997; BREITSCHWERDT et al.; 1998; BEXFIELD et al., 2005, KOHN et al., 2008; MAZEPA et al. 2010) onde as características da anaplasrose granulocítica são estudadas em um pequeno número de cães, focando apenas nos animais com sintomatologia clínica característica da anaplasrose granulocítica.

Na presente pesquisa, não houve associação estatística com a idade, porém um número expressivo de cães positivos (50%, n=12/24) pertenciam a faixa etária entre cinco e 10 anos. Em estudo realizado na Suécia a proporção de cães soropositivos aumentou com a idade (EGENVALL et al., 2000a), refletindo um aumento da probabilidade de exposição ao longo do tempo. A idade média de cães infectados com *A. phagocytophilum* tem sido aproximadamente seis a oito anos (GREIG et al., 1996; EGENVALL, et al., 1997; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008).

Na Alemanha, Kohn et al. (2010) não encontraram associação do sexo com a infecção por *A. phagocytophilum* tanto em cães com sintomatologia clínica quanto naqueles saudáveis. No presente estudo esse resultado também foi observado, no entanto, nenhum cão positivo na PCR apresentou sintomatologia clínica de anaplasmoose granulocítica. O percentual de animais infectados com *A. phagocytophilum* foi maior entre os cães com sintomatologia clínica (7,8%) quando comparado com cães saudáveis (3,8%) (KOHN et al. 2010). Segundo Egenvall et al. (1997) a presença de sinais clínicos característicos de doenças transmitidas por carrapatos é um fator de risco para a infecção em cães por *A. phagocytophilum*.

Cinco variantes genéticas de *A. phagocytophilum* com 1-2 diferenças de nucleotídeos em sequências parciais do gene 16S rRNA foram detectados em cães com anaplasmoose granulocítica no Estado de Washington, EUA (POITOUT et al., 2005). No entanto, as amostras de *A. phagocytophilum* podem variar entre as diferentes regiões no mundo. A variação genética pode ser responsável por alterações na patogenicidade de diferentes amostras de *A. phagocytophilum* e pode explicar porque um cão desenvolve doença clínica. No Brasil, mais estudos são necessários para avaliar a possível influência das variações genéticas nos resultados deste estudo.

No presente estudo, quando a definição racial foi avaliada em relação a infecção por *A. phagocytophilum* não observou-se diferença significativa ($p > 0,05$). Em um estudo realizado na Suécia, metade dos cães positivos para *A. phagocytophilum* foram da raça Goden Retrievers, provavelmente esse achado está relacionado com a popularidade dessa raça em exercer atividades extradomiciliares, o que possibilitaria um aumento no risco de exposição a carrapatos (EGENVALL et al. 1997). No presente estudo, um percentual de 62,5% ($n=15/24$) dos cães positivos para *A. phagocytophilum* não possuía raça definida, a maioria desses cães (93,33%, $n=13/14$) viviam soltos e tinham acesso a áreas de mata ou pastagem, condições que aumentam a probabilidade de exposição a carrapatos e o risco de infecção. A maioria das áreas de mata na região estudada é composta de matas secundárias ou de extensas áreas de plantação de eucalipto. Segundo Foley et al. (2009) o risco de transmissão de *A. phagocytophilum* é aumentado em florestas de mata secundária, pois neste ecossistema a biodiversidade das populações de roedores e seus carrapatos é maior, favorecendo a transmissão não só de *A. phagocytophilum*, mas também de outros agentes cujo o vetor é um carrapato. Dessa forma, um ecossistema com áreas de florestas intactas atua como um fator de proteção para doenças infecciosas emergentes de humanos e animais. Mudanças antropogênicas na integridade das florestas podem modificar a dinâmica e interações das populações de hospedeiros reservatórios e de artrópodes transmissores de agentes patogênicos podendo aumentar o risco de infecção, tanto em humanos quanto em cães, quando frequentam essas áreas.

Surpreendentemente, 70,83% ($n=17/24$) dos cães positivos na PCR para *A. phagocytophilum* recebem tratamento profilático com ectoparasiticidas. Konh et al. (2010) observaram que 42,86% ($n=9/21$) dos cães que receberam tratamento carrapaticida foram positivos para *A. phagocytophilum* na PCR. Provavelmente, esse elevado percentual esteja relacionado com a falta de percepção da infestação por carrapatos nos cães por parte dos proprietários, como também pela forma incorreta de aplicação do ectoparasiticida e a irregularidade no tratamento do ectoparasitismo nos cães. Assim, as informações obtidas por meio de questionário representam principalmente um marcador para avaliar a percepção do proprietário do cão em relação a infestação por carrapatos e o tratamento carrapaticida.

5.3.2 Fatores associados ao ectoparasitismo em cães com a infecção por *Anaplasma phagocytophilum*

A ocorrência de diferentes espécies de carrapatos em cães em diversas localidades é resultante das características epidemiológicas particulares de cada situação. Em áreas urbanas a espécie mais encontrada em cães é *R. sanguineus* (LINARDI; NAGEM, 1973; MASSARD et al., 1981; RIBEIRO et al., 1997), fato que foi confirmado no presente estudo. Esse carrapato, originário de Velho Mundo e introduzido no Brasil durante a colonização, já se encontrava distribuído em todas as regiões geográficas do Brasil na década de 30 (ARAGÃO, 1936). Em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma* infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas (MASSARD et al., 1981; LABRUNA et al., 2000). Na região Sudeste, as espécies de *Amblyomma* mais frequentemente encontradas em cães de áreas rurais são *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. cajennense* (ARAGÃO, 1936; MASSARD et al., 1981). Com exceção de *A. aureolatum*, as demais espécies de carrapatos foram encontradas em cães de áreas rurais na microrregião de Itaguaí. Neste estudo, a espécie *A. dubitatum* foi encontrada em cães que tinham acesso a áreas de mata onde foi constatada a presença de capivaras, o hospedeiro típico desta espécie de carrapato. Na região Sul destaca-se as espécies *Amblyomma tigrinum* e *A. aureolatum*, embora pelo menos outras quatro espécies de *Amblyomma* já tenham sido relatadas em cães (FREIRE, 1972). Na região Norte, a espécie *Amblyomma oblongoguttatum* foi relatada como a de maior ocorrência, seguida por *A. ovale* e *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2000).

A diversidade de espécies de carrapatos parasitando cães no Brasil é resultante dos diferentes ecossistemas do território nacional. Nesse sentido, as características ambientais e a diversidade de espécies de hospedeiros de cada área são os pontos fundamentais para a existência de determinadas espécies de carrapatos nos cães.

Anaplasma phagocytophilum é mantido no ciclo silvestre entre roedores e carrapatos do gênero *Ixodes* (RICHTER et al., 1996). Na microrregião estudada, a espécie *I. amarali* tem sido diagnosticada parasitando gambás do gênero *Didelphis* (FACCINI et al., 1999), no entanto, não existem relatos do parasitismo em cães por espécies de *Ixodes*, a despeito de vários levantamentos terem sido conduzidos na última década. O presente estudo foi realizado entre os meses de novembro e maio onde há uma maior atividade do estágio adulto de *A. cajennense* (OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al. 2002). A presença deste carrapato foi observada em 12 (50 %) dos 24 cães positivos na PCR em tempo real. A espécie *R. sanguineus* foi observada em nove cães (37,50%) e em cinco cães (20,83%) verificou-se infestação mista por *A. cajennense* e *R. sanguineus*. Esses dados sugerem a possibilidade das espécies *A. cajennense* e *R. sanguineus* estarem envolvidas na transmissão de *A. phagocytophilum* na região estudada. Em Berlin, Kohn et al. (2008) verificaram que a infecção por *A. phagocytophilum* em cães foi maior entre os meses de abril e setembro e que a distribuição sazonal mais provável da doença coincide com os picos de atividade de ninfas e adultos de espécie de carrapato do gênero *Ixodes*, sugerindo que os adultos pudessem ser os principais vetores. Esses resultados são semelhantes no que concerne a sazonalidade da espécie *A. cajennense*, observada neste trabalho.

Wu et al. (2009) verificaram que o histórico de infestação por carrapatos em cães apresentou associação com doenças transmitidas por carrapatos (Ehrlichiose, Babesiose e Borreliose). Neste estudo, a associação da infecção por *A. phagocytophilum* também foi observada com o histórico de infestação por carrapato relatado pelos proprietários. Essa associação não aconteceu com a presença de carrapatos nos cães no momento da coleta, apesar de ter sido observada uma tendência de infecção por *A. phagocytophilum* em cães infestados por carrapatos (66,67%). Entretanto, quando foi avaliado apenas os cães infestados em relação a infecção por *A. phagocytophilum* foi observada associação significativa ($p < 0,05$)

com a presença de *A. cajennense* sobre os cães. Essa associação não ocorreu em relação aos cães infestados por *R. sanguineus*. Vários estudos têm apresentado diferentes resultados considerando a exposição por carrapatos observada pelos proprietários. Por exemplo, infestação por carrapatos não foi descrita para nenhum dos cães com anaplasmoose granulocítica examinados por Poitout et al. (2005). Em um estudo na Suécia, exposição a carrapatos foi observado em 13 dos 14 cães examinados (EGENVALL et al. 1997), similar resultado também foi descrito por Kohn et al. (2008) que observaram infestação por carrapatos em 80% dos cães positivos para *A. phagocytophilum*.

5.4 Análise hematológica

Os parâmetros hematológicos que diferiram significativamente entre os cães positivos e negativos para *A. phagocytophilum* foram: número de plaquetas, volume plaquetário médio e o número absoluto de linfócitos. Segundo Greene (2006) a trombocitopenia na maioria das vezes vêm acompanhada por um aumento no volume da plaqueta, o que foi constatado no presente estudo. Diversos trabalhos na literatura demonstram que em infecções naturais e experimentais as principais alterações hematológicas foram trombocitopenia, anemia, linfopenia, monocitose, neutropenia, eosinofilia e leucocitose (COCKWILL et al., 2009; JESSEN et al., 2006; RAVNIK et al., 2011). Entre essas alterações hematológicas citadas acima, a mais consistente é a trombocitopenia (COCKWILL et al., 2009; RAVNIK et al. 2011). Um estudo realizado a partir de infecção experimental demonstrou que a trombocitopenia ocorreu em 100% dos cães infectados, já em infecções naturais esse percentual foi de 80% (LILLIEHOOK et al., 1998). A trombocitopenia é comum em humanos e animais infectados por espécies de *Ehrlichia* (WOODY et al., 1991; EGENVALL et al., 1997; NEER et al., 2002). O mecanismo para a trombocitopenia pode ser em função do consumo de plaquetas, hiperesplenismo, destruição imuno mediada ou produção de fatores inibitórios (LILLIEHOOK et al., 1998; GREIG et al., 2006; FOLEY et al., 2007a; BEXFIELD et al., 2005). A trombocitopenia é mais intensa durante o pico de parasitemia, retornando ao seu valor normal depois de sete dias (LILLIEHOOK et al., 1998; ENGEVALL, et al., 1998). O aumento do volume plaquetário ocorre em função da liberação de plaquetas imaturas, sugerindo uma resposta medular. No entanto, doenças mieloproliferativa, púrpura trombocitopênica trombótica, coagulação intravascular disseminada, síndromes mieloproliferativas, pós-esplenectomia, estados esplênicos, diabetes melítus e doença vascular podem contribuir para alterações no volume plaquetário (ZAGO et al., 2004; GREISENEGGER et al., 2004).

Nenhum dos 24 animais positivos na PCR apresentou sinais clínicos sugestivos de anaplasmoose granulocítica, o que condiz com os elevados valores de C_T (baixa quantidade do parasito circulante) obtidos na PCR em tempo real. Dessa forma, observou-se neste estudo que a grande maioria das alterações foram leves, com valores próximos ao limite inferior do intervalo de referência. Um baixo percentual de cães apresentaram alterações hematológicas como: monocitopenia (8,33%), monocitose (4,17%), leucocitose (20,83%) e leucopenia (4,17%). A trombocitopenia (58,33%), anemia (54,17%) e linfopenia (41,67%) foram as alterações mais frequentes observadas entre os cães positivos na PCR. Kohn et al. (2008) verificaram que a trombocitopenia (87%), a linfopenia (36%) e a leucopenia (27%) foram algumas das alterações mais frequentes em 18 cães positivos para *A. phagocytophilum*, resultado semelhante ao observado na presente pesquisa.

Kohn et al. (2008) e Granick et al. (2009) observaram anemia em aproximadamente metade dos cães infectados por *A. phagocytophilum*, resultado similar ao obtido neste trabalho. Em um estudo experimental, nove cães inoculados com *A. phagocytophilum* desenvolveram uma anemia normocítica normocrômica, lembrando uma anemia de

inflamação (LILLIEHÖÖK et al. 1998). Hemólise pode ser outro patomecanismo, já que cães com anemia tiveram hiperbilirubinemia (KOHN et al., 2008). Anticorpos anti-eritrócitos e aglutinação de eritrócitos foram detectados no soro de cães infectados com uma cepa de *A. phagocytophilum* nos Estados Unidos (GOLDMAN et al., 1998).

Segundo Kohn et al. (2010) os cães positivos na PCR para *A. phagocytophilum* podem não apresentar qualquer alteração hematológica. Consequentemente, exames de rotina através de técnicas de PCR espécie-específica para *A. phagocytophilum* em cães doadores de sangue devem ser recomendado para minimizar os riscos de transmissão.

As alterações hematológicas são bastante variáveis e intimamente relacionadas com a fase da história natural da anaplasose granulocítica pela qual o cão está passando no momento do diagnóstico. Além disso, os parâmetros hematológicos parecem não serem adequados para discriminar entre anaplasose granulocítica e outras doenças como a babesiose, ehrlichiose e a anaplasose causada por *A. platys*. No entanto, o tamanho amostral em estudos populacionais é fundamental para a análise estatística extensa e geração resultados confiáveis a respeito da significância de alterações laboratoriais. O presente trabalho confirmou, com base em estudo populacional, que a alteração hematológica significativamente ($p < 0,05$) mais frequente em cães infectados por *A. phagocytophilum* é a trombocitopenia.

5.5 Avaliação hemoparasitológica por esfregaço sanguíneo.

Inclusões em neutrófilos sugestivas de *A. phagocytophilum* não foram verificadas nas 398 amostras de sangue analisadas através do esfregaço sanguíneo. Tal fato pode ser explicado pelo curto período de bacteremia, inferior a 28 dias (BAKKEN et al., 2008). Em infecções experimentais, as mórulas de *A. phagocytophilum* podem ser visualizadas no citoplasma dos neutrófilos de 4 a 14 dias pós- infecção e somente são observadas por um período 4 a 8 dias (ENGEVALL et al., 1998). Além do curto período de bacteremia, o percentual de neutrófilos infectados na fase aguda da doença pode variar de 1 a 42% (ENGEVALL et al., 1998; POITOUT et al., 2005; KIRTZ et al., 2005), o que certamente comprometeu o diagnóstico parasitológico através do esfregaço de sangue, já que no presente estudo, em nenhum cão foi observado sintomatologia clínica sugestiva de AGC. Um aspecto que merece atenção no momento da avaliação parasitológica de esfregaços sanguíneos é a possibilidade de dúvida no diagnóstico de *A. phagocytophilum* com base nas inclusões intracitoplasmáticas em neutrófilos, já que a espécie *Ehrlichia ewingii* diagnosticada em cães no Brasil por Oliveira et al. (2008) possui características morfológicas semelhantes e também infecta esse tipo celular (PREOZI; COHN, 2002). Dessa forma, a análise por meio da PCR é o teste de diagnóstico de escolha, e é o método mais confiável e específico para o diagnóstico precoce da ehrlichiose granulocítica (EGENVALL et al., 1996, GREIG, 2000).

Poucos estudos têm sido realizados no Brasil com o objetivo de detectar *A. phagocytophilum* em animais domésticos. O diagnóstico molecular deste microrganismo em cães é o ponto de partida para novos estudos que visam o isolamento em cultivo celular e a caracterização molecular das cepas que circulam no Brasil, além da identificação dos possíveis vetores. Provavelmente, em função da diversidade de hospedeiros de *A. phagocytophilum*, diferentes variantes genéticas podem infectar cães. O conhecimento dessas variantes genéticas pode contribuir para o aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico e o entendimento da cadeia epidemiológica da AGC no Brasil.

6. CONCLUSÕES

Anaplasma phagocytophilum infecta cães na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Carrapatos das espécies *A. cajennense* e *R. sanguineus* se infectam naturalmente com *A. phagocytophilum* na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

A técnica de PCR em tempo real utilizando o gene *msp2* é uma ferramenta de diagnóstico precisa para determinar a ocorrência de *A. phagocytophilum* em cães e carrapatos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; KALANTARPOUR, F.; BALUCH, M.; HOROWITZ, H. W.; MCKENNA, D. F.; RAFFALLI, J. T.; HSIETH, T. C.; WU, J.; DUMLER, J. S.; WORMSER, G.P. Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.635–638, 2000.
- 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.
- AKKOYUNLU, M.; FIKRIG, E. Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. **Infection and Immunity**, v.68, n.4, p.1827-1833, 2000.
- AKKOYUNLU, M.; MALAWISTA, S.E.; ANGUITA, J.; FIKRIG, E. Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Infection and Immunity**, v.69, n.9, p.5577–5588, 2001.
- ALBERDI, M.P.; WALKER, A.R.; URQUHART, K.A. Field evidence that roe deer (*Caprioles carpeolus*) are natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. **Epidemiology and Infection**, v.124, n.2, p.315-323, 2000.
- ALLEMAN, A.R.; WAMSLEY, H.L. An update on anaplasmosis in dogs. **Veterinary Medicine**, v.103, n.4, p.212-214, 2008.
- AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M.A.; KAKOMA, I.; SAINZ, A. Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v.8, n.6, p.797–803, 2008.
- ANDERSON, B.E.; GREENE, C.E.; JONES, D.C.; DAWSON, J.E. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.42, n.2, p.299-302, 1992.
- ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, p.759-843, 1936.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII lista e chave para os representantes para a fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115-129, 1961.
- ARSENAULT, W.G.; MESSICK, J.B. Acute granulocytic ehrlichiosis in a Rottweiler. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.41, p.323-326, 2005.
- AYRES, M. **BioEstat 2.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2000. 272 p.
- BAKKEN, J.S.; DUMLER, S. Human granulocytic anaplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.22, n.12, p.443-448, 2008.
- BAKKEN, J.S.; KRUEH, J.; WILSON-NORDSKOG, C.; TILDEN, R.L.; ASANOVICH, K.; DUMLER, J.S. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of the American Medical Association**, v.275, n.12 p.199-205, 1996a.
- BAKKEN, J.S.; KRUEH, J.K.; LUND, T.; MALKOVITCH, D.; ASANOVICH, K.; DUMLER, J.S. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.23, n.1, p.198, 1996b.

- BARBET, A.F.; LUNDGREN, A.; YI, J.; RURANGIRWA, F.R.; PALMER, G.H. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. **Infection and Immunity**, v.68, n.11, p.6133-6138, 2000.
- BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E. KRAMER, V.L.; CLOVER, J.R.; SHELLY, S.M.; DUMLER, J.S. *Ehrlichia* strain from a llama (*Lama glama*) and llama-associated ticks (*Ixodes pacificus*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.1005-1007, 1997a.
- BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E.; KRAMER, V.L.; CLOVER, J.R.; HUI, L.T.; WEBB, J.P.; VREDEVOE, L.K. *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2018–2021, 1997b.
- BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E.; DEROCK, E.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p.3333-3334, 1996.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1º ed. São Paulo: VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, 2006. v.14. 223 p.
- BARUTZKI, D.; DE NICOLA, A.; ZEZIOLA, M.; REULE, M. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.119, n.7-8, p.342-347, 2006.
- 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.
- BEHL, R.; KLEIN, M.B.; DANDELET, L.; BACH, R.R.; GOODMAN, J.L.; KEY, N.S. Induction of tissue factor procoagulant activity in myelomonocytic cells inoculated by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v.83, n.1, p.114-118, 2000.
- BELL, C.; PATEL, R. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. **Diagnostic Microbiology and Infection Diseases**, v. 53, n.1, p. 301-306, 2005.
- BEXFIELD, N.H.; VILLIERS, E.J.; HERRTAGE, M.E. Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. **The Journal of Small Animal Practice**, v.46, n.11, p.543-548, 2005.
- BIRKNER, K.; STEINER, B.; RINKLER, C.; KERN, Y.; AICHELE, P.; BOGDAN, C.; LOEWENICH, F.D. The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD41 T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. **European Journal of Immunology**, v.38, p.3395-3410, 2008.
- BJOERSDORFF, 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**, v. 40, n.1, p. 20-24, 1999.
- BLANCO, J.R.; OTEO, J.A. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.12, p.763-772, 2002.

- BORJESSON, D.L.; SIMON, S.I.; TABLIN, F.; BARTHOLD, S.W. Thrombocytopenia in a mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.184, n.11, p.1475-1479, 2001.
- BOWMAN, D.; LITTLE, S.E.; LORENTZEN, L.; SHIELDS, J.; SULLIVAN, M.P.; CARLIN, E.P. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.138-148, 2009.
- BOWN KJ, BEGON M, BENNETT M, WOLDEHIWET Z, OGDEN NH. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. **Emerging Infection Diseases**, v.9, p.63–70, 2003.
- BRAYTON, K. A., KNOWLES, D. P., MCGUIRE, T. C., PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenetic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. **Proceeding National American Society**, v. 98, p.4130-4135, 2001.
- 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, 1998.
- BURKET, C.T.; VANN, C.N.; PINGER, R.R.; CHATOT, C.L.; STEINER, F.E. Minimum infection rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in southern Indiana. **Journal Medical Entomology**, v.35, n.5, p.653–659, 1998.
- CAO, W.C.; ZHAN, L.; HE, J.; FOLEY, J. E.; DE VLAS, S.J.; MINGWU, X.; YANG, H.; RICHARDUS, J. H.; J. HABBEMA, D.F. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.4, p. 664–668, 2006.
- CAO, W.C.; ZHAO, Q.M.; ZHANG, P.H.; DUMLER, J.S.; ZHANG, X.T.; FANG, L.Q.; YANG, H. Granulocytic ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.11, p.4208-4210, 2000.
- CARLYON, J.A.; FIKRIG, E. Mechanism of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. **Current Opinion in Hematology**, v.13, n.1, p.28-33, 2006.
- CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.; WALKER, D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.3, p.589-595, 1994.
- CHOI, K.S.; GARYU, J.; PARK, J.; DUMLER, S. Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin. **Infection and Immunity**, v.71, n.8, p.4586-4594, 2003.
- COCKWILL, K.R.; TAYLOR, S.M.; SNEAD, E.C.R.; DICKINSON, R.; COSFORD, K.; MALEK, S.; LINDSAY, L.R.; DINIZ, P.P. Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, n.8, p.835-840, 2009.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3º Ed. Manole, São Paulo. 1984. 566p.
- 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.

- COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; CLINKENBEARD, K.D.; MEINKOTH, J.H. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.8 p.1093-1095, 1988.
- DAGNONE, A.S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p. 20-25, 2009.
- DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Genetic diversity of Anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p.75–89, 2005a.
- DE LA FUENTE, J.; MASSUNG, R.F.; WONG, S.J.; CHU, F.K.; LUTZ, H.; MELI, M.; VON LOEWENICH, F.D.; GRZESZCZUK, A.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; MANGOLD, A.J.; NARANJO, V.; STUEN, S.; KOCAN, K.M. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1309-1317, 2005b.
- DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; ALMAZÁN, C.; KOCAN, K.M.; MARTÍN, M.P.; GORTÁZAR, C. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, n. 1, p. 187–196, 2004.
- DE LA FUENTE, J.; RUIZ-FONS, F.; NARANJO, V.; TORINA, A.; RODRÍGUEZ, O.; GORTÁZAR, C. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. **Research in Veterinary Science**, v.84, n.3, p.382-386, 2008.
- DE PAIVA DINIZ, P.P; SCHWARTZ, D.S; DE MORAIS, H.S; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.7, n.4, p.689–697, 2007.
- DINIZ, P.; BEALL, M.J.; OMARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.A.; CYR, K.E.; KOTERSKI, J.F.; ROBBINS, R.G.; LALO, P.G.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. High prevalence of tickborne pathogens in dogs from an Indian Reservation in northeastern Arizona. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n.2, p.117-123, 2010.
- DRAZENOVICH, N.; BROWN, R.N.; FOLEY, J.E. 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.; 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.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*,

descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p.2145-2165, 2001.

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.

EBANI, V.; CERRI, D.; FRATINI, F.; AMPOLA, M.; ANDREANI, E. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. **New Microbiologica**, v.31, n.3, p.371-375, 2008.

EGENVALL, A.; BJOERSDORFF, A.; LILLIEHOOK, I.; ENGVALL, E.O.; KARLSTAM, E.; ARTURSSON, K.; HEDHAMMAR, A.; GUNNARSSON, A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. **Veterinary Record**, v.143, n.15, p.412-417, 1998.

EGENVALL, A.; BONNETT, B.N.; GUNNARSSON, A.; HEDHAMMAR, A.; SHOUKRI, M.; BORNSTEIN, S.; ARTURSSON, K. Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish dogs 1991–94. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v.32, n.1, p.19-25, 2000a.

EGENVALL, A.; LILLIHOO, K.I.; KARLSTAM, E.; BJOERSDORFF, A.; ENGVALL, E.O.; ARTURSSON, K.; HELDTANDER, M.; GUNNARSSON, A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. **Veterinary Record**, v.146, n.7, p.186-190, 2000b.

EGENVALL, A.E.; HEDHAMMAR, A.A.; BJOERSDORFF, A.I. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. **Veterinary Record**, v.140, n.9, p.222-226, 1997.

EGENVALL, E.O.; PETTERSSON, B.; PERSSON, M.; ARTURSSON, K.; JOHANSSON, K.E. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.9, p.2170-2174, 1996.

FACCINI, J.L.H.; PRATA, M.C.A.; DAEMON, E.; BARROS-BATTESTI, D.M. Características biológicas da fase não parasitária do *Ixodes amarali* (Acari: Ixodidae) em gambá (*Didelphis* sp.) no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 267-270, 1999.

FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 112, n. 11, p.785–807, 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Edição. EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 103p.

FOGGIE, A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.63, n.1, p.1-15, 1951.

FOGGIE, A. Studies on tick pyaemia and tick-borne fever. **Symposium of the Zoological Society of London**, v.6, n.1, p.51-58, 1962.

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

- FOGGIE, A. The effect of tick-borne fever on the resistance of lambs to staphylococci. **Journal of Comparative Pathology**, v.66, p.278-285, 1956.
- FOLEY, J.; DRAZENOVICH, N.; LEUTENEGGER, C.; CHOMMEL, B.B. Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. **Veterinary Record**, v.160, n.5, p.159-162, 2007a.
- FOLEY, J.E.; BROWN, R.N.; GABRIEL, M.W.; HENN, J.; DRAZENOVICH, N.; KASTEN, R.; GREEN, S.L.; CHOMEL, B.B. Spatial analysis of the exposure of dogs in rural north-coastal California to vectorborne pathogens. **Veterinary Record**, v.161, n.19, p.653-657, 2007b.
- FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; BROWN, R.N.; LANE, R.S.; DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in the western United States. **Journal of Vector Ecology**, v.29, n.1, p.41-50, 2004.
- 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.
- FOLEY, J.E.; KRAMER, V.L.; WEBER, D. Experimental ehrlichiosis in dusky footed woodrats (*Neotoma fuscipes*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, n.1, p.194-198, 2002.
- FOLEY, J.E.; NIETO, N.C.; ADJEMIAN, J.; ADJEMIAN, J.; DABRITZ, H.; BROWN, R.N. *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of *Ixodes* ticks, western United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.7, p.1147-1150, 2008a.
- FOLEY, J.E.; NIETO, N.C.; MADIGAN, J.; SYKES, J. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the western United States. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.94-97, 2008b.
- FOLEY, J. E.; NIETO, N.C.; FOLEY, P. Emergence of Tick-Borne Granulocytic Anaplasmosis Associated with Habitat Type and Forest Change in Northern California. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n.6, p. 1132-1140, 2009.
- FOSTER, W.N.M.; GREIG, J.C. Isolation of tick-borne fever from feral goats in New Galloway. **Veterinary Record**, v.85, p. 585-586, 1969.
- FREIRE, J.J. Revisão das espécies da família Ixodidae. **Revista de Medicina Veterinária**, v.8, p.1-16, 1972.
- GARCIA-GARCIA, J.C.; RENNOLL-BANKERT, K.E.; PELLY, S.; MILSTONE, A.M.; DUMLER, J.S. Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector AnkA of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. **Infection and Immunity**, v.77, n.6, p.2385-2391, 2009.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. "Phylum XIV. Proteobacteria phyl. nov." In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M. (eds.) **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**, 2º edição, v. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer, New York, 2005, p.1.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. Class I. *Alphaproteobacteria* class. nov. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G. M. (eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2º edição, v.2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), Springer, New York, 2006, p.1.

- GARY, A.T.; WEBB, J.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. The low seroprevalence of tick-transmitted agents of disease in dogs from southern Ontario and Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, n.12, p.1194-1200, 2006.
- GARYU, J.W.A.; CHOI, K.S.; GRAB, D.J.; DUMLER, J.S. Defective phagocytosis in *Anaplasma Phagocytophilum*-infected neutrophils. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, p.1187-1190, 2005.
- GIBSON, U.; HEID, C.; WILLIAMS, P. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996.
- GILMOUR, J.L.; BRODIE, T.A.; HOLMES, P.H. Tick-borne fever and pasteurellosis in sheep. **Veterinary Record**, v.111, n.22, p.512, 1982.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**. v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.
- 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.
- GOODMAN, J.L.; NELSON, C.; VITALE, B.; ET AL. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 209–215, 1996.
- GOODMAN, J.L.; NELSON, C.M.; KLEIN, M.B.; HAYES, S.F.; WESTON, B.W. Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. **Journal of Clinical Investigation**, v.103, n.3, p.407-412, 1999.
- GRANICK, J.L.; RENEER, D.V.; CARLYON, J.A.; BORJESSON, D.L. *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocyte lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.416-423, 2008.
- GRANQUIST, E.G.; STUEN, S.; LUNDGREN, A.M.; BRATEN, M.; BARBET, A.F. Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. **Infection and Immunity**, v.76, n.1, p.120-126, 2008.
- GRAVINO, A.E.; CAPRARIIS, S.; MANNA, L.; CERUNDOLO, R.; SAGAZIO, P.; BUONAVOGLIA, C. Preliminary report of infection in dogs related to *Ehrlichia equi*: Description of three cases. **New Microbiologica**, v.20, n.3, p.361-363, 1997.
- GRAY, D.; WEBSTER, K.; BERRY, J.E. Evidence of louping ill and tickborne fever in goats. **Veterinary Record**, v.122, n.3, p.66, 1988.
- GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3^{ed}. Philadelphia: Saunders, Elsevier. 2006, 1387 p.
- GREIG, B.; ASANOVICH, K.M.; ARMSTRONG, P.J. DUMLER, J.S. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.1, p.44–48, 1996.
- GREISENEGGER, S.; ENDLER, G.; HSIEH, K.; TENTSCHERT, S.; MANNHALTER, C.; LALOUSCHEK, W. Is Elevated Mean Platelet Volume Associated With a Worse Outcome in Patients With Acute Ischemic Cerebrovascular Events? **Stroke**, v.35, n. 7 p.1688-1691, 2004
- GRONSTOL, H.; OVERA, S.J. Listeriosis in sheep. Tick-borne fever used as a model to study predisposing factors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.21, n.4, p.533-545, 1980.

- GUY, E.; TASKER, S.; JOYNSON, D.H. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in UK ticks using polymerase chain reaction. **Epidemiology of Infection**, v.121, p.681–683, 1998.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- HENN, J.B.; GABRIEL, M.W.; KASTEN, R.W.; BROWN, R.N.; THEIS, J.H.; FOLEY, J.E.; CHOMEL, B.B. Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a *Bartonella clarridgeiae*-like bacterium and domestic dogs as sentinels for zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.8, p.2411-2418, 2007.
- HODZIC, E.; IJDO, J.W.; FENG, S.; KATAVOLOS, P.; SUN, W.; MARETZKI, C.H.; FISH, D.; FIKRIG, E.; TELFORD, S.R.3rd; BARTHOLD, S.W. Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, n.3, p.737-745, 1998.
- HOROWITZ, H.W.; KILCHEVSKY, E.; HABER, S.; AGUERO-ROSENFELD, M.; KRANWINKEL, R.; JAMES, E.K.; WONG, S.J.; CHU, F.; LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n.6, p.375-378, 1998.
- INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.7, p.815-817, 2001.
- JADERLUND, K.H.; EGENVALL, A.; BERGSTROM, K.; HEDHAMMAR, A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. **Veterinary Record**, v.160, n.24, p.825-831, 2007.
- JENKINS, A.; HANDELAND, K.; STUEN, S.; SCHOULS, L.; VAN DE POL, I.; MEEN, R.; KRISTIANSEN, B.E. Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. **Journal Wildlife Diseases**, v.37, n.1, 201–203, 2001.
- JENSEN, J.; SIMON, D.; MURUA ESCOBAR, H.; SOLLER, J.T.; BULLERDIEK, J.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; NOLTE, I. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. **Zoonoses and Public Health**, v.54, n.2, p.94-101, 2007.
- JOHANSSON, K.E.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; GUNNARSSON, A.; MALMQVIST, M.; OLSSON, E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horse by direct solid phase sequencing of PCR products. **Research in Veterinary Science**, v.58, n.2, p.109-112, 1995.
- KATAVOLOS, P.; ARMSTRONG, P.M.; DAWSON, J.E.; TELFORD, S.R.3rd. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. **The Journal Infectious Diseases**, v.177, n.5, p.1422-1425, 1998.
- KEMPERMAN, M.; NEITZEL, D.; JENSEN, K.; J. GORLIN, J.; E. PERRY, E.; MYERS, T.; MILEY, T.; MCQUISTON, J.; EREMEEVA, M.E.; NICHOLSON, W.; SINGLETON, J.; ADJEMIAN, J. *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion-Minnesota, 2007. **Journal of the American Medical Association**, v.300, n.23, p.2718-2720, 2008.
- KIM, C.M.; KIM, M.S.; PARK, M.S.; PARK, J.H.; CHAE, J.S. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v.3, p.17–26, 2003.

- KIRTZ, B., CZETTEL, B., THUM, D., LEIDINGER, E. *Anaplasma phagocytophilum* in einer österreichischen Hundepopulation: eine Prävalenz-Studie (2001–2006). **Kleintierpraxis**, v.52, p.562–568, 2007.
- KIRTZ, G.; MELI, M.; LEIDINGER, E.; LUDWIG, P.; THUM, D.; CZETTEL, B.; KÖLBL, S.; LUTZ, H. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: Identifying the causative agent using PCR. **The Journal of Small Animal Practice**, v.46, n.6, p.300-303, 2005.
- KLEIN, M.B.; MILLER, J.S.; NELSON, C.M.; GOODMAN, J.L. Primary bone marrow progenitors of both granulocytic and monocytic lineages are susceptible to infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.176, n.5, p.1405-1409, 1997.
- KOHN, B.; GALKE, D.; BEELITZ, P.; PFISTER, K. Clinical features of canine granulocytic ehrlichiosis in 18 naturally infected dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, n.6, p.1289-1295, 2008.
- KOHN, B.; SILAGHI, C.; GALKE, D.; ARNDT, G.; PFISTER, K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. **Research in Veterinary Science**, 2010, in press.
- KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R.; MCPHERSON, J.T.; MACCORMACK, J.N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2631-2638, 1999.
- KRAUSE, P.J.; WORMSER, G.P. Nosocomial transmission of granulocytic anaplasmosis? **Journal of the American Medical Association**, v.300, n.19, p.2308-2309, 2008.
- LABRUNA, M.B., HOMEM, V.S.F., HEINEMANN, M.B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, Eastern Amazon-Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.37, p.774-776, 2000.
- LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.1, p.65-77, 2002.
- 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.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A.; DUNNIGAN, B.; RHA, J.Y.; WILLIAMS, C.R.; BREWER, M.; FALL, M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, n.6, p.893-896, 2004.
- LASCOLA, K.; VANDIS, M.; BAIN, P.; BEDENICE, D. Concurrent infection with *Anaplasma phagocytophilum* and *Mycoplasma haemolamae* in a young alpaca. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.2, p.379-382, 2009.
- 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.
- LEE, H.C.; KIOI, M.; HAN, J.; PURI, R.K.; GOODMAN, J.L. *Anaplasma phagocytophilum* induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells. **Genomics**, v.92, n.3, p.144-151, 2008.

- 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.
- LESTER, S.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; COLLIS, C.D.; HEGARTY, B.C. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. **The Canadian Veterinary Journal**; v.46, n.9, p.825-827, 2005.
- LEVI, O.; WANER, T.; BANETH, G.; KEYSARY, A.; BRUCHIM, Y.; SILVERMAN, J.; HARRUS, S. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.53, p.78-80, 2006.
- LIDDELL, A.M.; STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A.; SUMNER, W.; PADDOCK, C.D.; GAUDREAU-KEENER, M.; ARENS, M.Q.; STORCH, G.A. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4617-4622, 2003.
- LILLIEHOOK, I.; EGENVALL, A.; TVEDTEN, H.W. Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic *Ehrlichia* species. **Veterinary Clinical Pathology**, v.27, n.4, p.116-122, 1998.
- LILLIEHOOK, I.; JOHANNISSON, A.; MAGNUSSON, U.; EGENVALL, A.; TROWALDWIG, G.; HÅKANSSON, L. Granulocyte function in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic *Ehrlichia* species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.67, n.2, p.141-152, 1999.
- LINARDI, P.M., NAGEM, R.L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v.33, p.529-538, 1973.
- LIZ, J.S.; SUMNER, J.W.; PFISTER, K.; BROSSARD, M. PCR detection of and serological evidence of granulocytic Ehrlichia; infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.892-897, 2002.
- LOTIC-FURLAN, S.; AVSIC-ZUPANC, T.; PETROVEC, M.; NICHOLSON, W.L.; SUMNER, J.W.; CHILDS, J.E.; STRLE, F. Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.5, p.899-903, 2001.
- M'GHIRBI, Y.; GHORBEL, A.; AMOURI, M.; NEBAOUI, A.; HADDAD, S. Clinical, serological and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitology Research**, v.104, n. 4, p.767-774, 2009.
- MACLEOD, J. Studies on tick-borne fever of sheep. II. Experiment on transmission and distribution of the disease. **Parasitology**, v.28, p.320-329, 1936.
- MACLEOD, J.; GORDON, W.S. Studies on tick-borne fever of sheep. I. Transmission by the tick *Ixodes ricinus* with a description of the disease produced. **Parasitology**, v.25, p.273-283, 1933.
- MADEWELL, B.; GRIBBLE, D. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. **Journal of the American Medical Association**, v.180, n. 5, p.512-514, 1982.
- MADIGAN, J.E.; GRIBBLE, D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). **Journal of the American Medical Association**, v.190, n. 4, p.445- 448, 1987.
- MAGNARELLI, L.; IJDO, J.; ANDERSON, K.; MADIGAN, J.E.; DUMLER, J.S.; FIKRING, E. Antibodies to *Ehrlichia equi* in dogs from the northeastern United States. **Journal of the American Medical Association**, v.211, n. 9, p.1134-1137, 1997.

- MAGNARELLI, L.A.; IJDO, J.W.; VAN ANDEL, A.E.; WU, C.; FIKRIG, E. Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.1, p.29-32, 2001.
- MANNA, L.; ALBERTI, A.; PAVONE, L.M.; SCIBELLI, A.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in South Italy. **Veterinary Journal**, v.167, n. 3, p.224-227, 2004.
- MARETZKI, C.H.; FISHER, D.J.; GREENE, C.E. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. **Journal of the American Medical Association**, v.205, n. 11, p.1554-1556, 1994.
- MARTIN, M.E.; CASPERSEN, K.; DUMLER, J.S. Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon-gamma and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. **American Journal Pathology**, v.158, n.5, p.1881-1888, 2001.
- MASSARD, C.A., MASSARD, C.L., REZENDE, H.E.B. et al. Carrapatos de cães em áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, 6, 1981, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: SBP, 1981. p.201.
- MASSUNG, R.F.; COURTNEY, J.W.; HIRATZKA, S.L.; PITZER, V.E.; SMITH, G.; DRYDEN, R.L. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n. 10, p.1604-1606, 2005.
- MASSUNG, R.F.; MATHER, T.N.; LEVIN, M.L. Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **Infection and Immunity**, v.74, n. 2, p.1373-1375, 2006.
- MASSUNG, R.F.; MAUEL, M.J.; OWENS, J.H.; ALLAN, N.; COURTNEY, J.W.; STAFFORD 3rd, K.C.; MATHER, T.N. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p.467-472, 2002.
- MASSUNG, R.F.; PRIESTLEY, R.A.; MILLER, N.J.; MATHER, T.N.; LEVIN, M.L. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, n. 11, p.1757-1763, 2003.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, K.G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n. 2, p.717-722, 2003.
- MAZEPA, A.W.; KIDD, L.B.; YOUNG, K.M.; TREPANIER, L.A. Clinical Presentation of 26 *Anaplasma phagocytophilum*-Seropositive Dogs Residing in an Endemic Area. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p.405-12, 2010.
- MCDIARMID, A. Modern trends in animal health and husbandry. Some infectious diseases of free-living wild-life. **British Veterinary Journal**, v.121, p.245-257, 1965.
- MUNDERLOH, U.G.; LYNCH, M.J.; HERRON, M.J.; PALMER, A.T.; KURTTI, T.J.; NELSON, R.D.; GOODMAN, J.L. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. **Veterinary Microbiology**, v.101, n. 1, p.53-64, 2004.
- MUNRO, R.; HUNTER, A.R.; MACKENZIE, G.; MCMARTIN, D.A. Pulmonary lesions in sheep following experimental infection by *Ehrlichia phagocytophilia* and *Chlamydia psittaci*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 92, p.117-129, 1982.
- NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPIN, M.R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM.

- American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medical**, v.16, p. 30–315, 2002.
- NIETO, N.C.; FOLEY, J. Evaluation of squirrels (Rodentia: Sciuridae) as ecologically significant hosts for *Anaplasma phagocytophilum* in California. **Journal of Medical Entomology**, v.45, n. 4, p.763-769, 2008.
- NIETO, N.C.; FOLEY, J.E.; BETTASO, J.; LANE, R.S. Reptile infection with *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of granulocytic anaplasmosis. **Journal Parasitology**, v.95, n.5, p.1165–1170, 2009.
- NIJHOF, A.M.; BODAAN, C.; POSTIGO, M.; , NIEUWENHUIJS, H.; OPSTEEGH, M.; FRANSSEN, L.; JEBBINK, F.; JONGEJAN, F. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, n. 4, p.585-595, 2007.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.
- NYARKO, E.; GRAB, D.J.; DUMLER, J.S. *Anaplasma phagocytophilum*- infected neutrophils enhance transmigration of *Borrelia burgdorferi* across the human blood brain barrier in vitro. **International Journal for Parasitology**, v.36, n. 5, p.601-605, 2006.
- OGDEN, N.H.; CASEY, A.N.J.; FRENCH, N.P.; WOLDEHIWET, Z. A review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. **Experimental and Applied Acarology**, v.28, n. 1-4, p.195-202, 2002.
- OHASHI, N.; INAYOSHI, M.; KITAMURA, K.; KAWAMORI, F.; KAWAGUCHI, D.; NISHIMURA, Y.; NAITOU, H.; HIROI, M.; MASUZAWA, T. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. **Emerging Infection Diseases**, v.11, p.1780–1783, 2005.
- OLIVEIRA P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1987) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, n.4, p.295-301, 2000.
- OLIVEIRA, L.S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURAO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, M.R.; CONCEICAO, L.G.; GALVAO, M.A.M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, p.55–56, 2009.
- OVERAS, J.; LUND, A.; ULVUND, M.J.; WALDELAND, H. Tick-borne fever as a possible predisposing factor in septicaemic pasteurellosis in lambs. **Veterinary Record**, v.133, n. 16, p.398, 1993.
- PANCHOLI, P.; KOLBERT, C.P.; MITCHELL, P.D.; REED, K.D.J.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S.; TELFORD, S.R.; PERSING, D.H. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of Infection Diseases**, v.172, p.1007–1012, 1995.
- PEDRA, J.H.; SUTTERWALA, F.S.; SUKUMARAN, B.; et al. ASC/ PYCARD and Caspase-1 regulate the IL-18/IFN-gamma axis during *Anaplasma phagocytophilum* infection. **The Journal of Immunology**, v.179, n. 7, p.4783-4791, 2007a.
- PEDRA, J.H.; TAO, J.; SUTTERWALA, F.S.; SUKUMARAN, B.; BERLINER, N.; BOCKENSTEDT, L.K.; FLAVELL, R.A.; YIN, Z.; FIKRIG, E. IL-12/23p40-dependent

- clearance of *Anaplasma phagocytophilum* in the murine model of human anaplasmosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.50, n. 3, p.401-410, 2007b.
- PETROVEC, M.; BIDOVEC, A.; AVSIC-ZUPANC, T.; KOREN, S.; SUMNER, J.W.; NOCHOLSON, W.L.; CHILDS, J.E. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.114, n. 13-14, p.641-647, 2002.
- PETROVEC, M.; LOTRIC FURLAN, S.; ZUPANC, T.A.; STRLE, F.; BROUQUI, P.; ROUX, V.; DUMLER, J.S. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n. 6, p.1556-1559, 1997.
- PIEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n. 5, p.1633-1644, 2007.
- 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.
- PREOZI, D.E.; COHN, L.A. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n. 4, p. 277-288, 2002.
- 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.
- POLIN, H.; HUFNAGL, P.; HAUNSCHMID, R.; GRUBER, F.; LADURNER, G. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p.2285-2286, 2004.
- 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.
- PUSTERLA, N.; ANDERSON, R.J.; HOUSE, J.K.; PUSTERLA, J.B.; DEROCK, E.; MADIGAN, J.E. Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n. 7, p.1160-1162, 2001.
- PUSTERLA, N.; HUDER, J.; WOLFENSBURGER, C. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**; v.35, n.9, p.2307-2309, 1997.
- PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; HUDER, J.B.; WEBER, R.; BRAUN, U.; LUTZ, H. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1332-1334, 1999a.
- PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J.B.; BRAUN, U.; LUTZ, H. Experimental cross-infections with *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. **Veterinary Record**, v.145, p.311-314, 1999b.
- PUSTERLA, N.; MADIGAN, J.E.; ASANOVICH, K.M.; CHAE, J.S.; DEROCK, E.; LEUTENEGGER, C.M.; PUSTERLA, J.B.; LUTZ, H.; DUMLER, J.S. Experimental Inoculation with Human Granulocytic Ehrlichia Agent Derived from High- and Low-Passage Cell Culture in Horses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, p.1276-1278, 2000.
- PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J.B.; DEPLAZES, P.; WOLFENSBURGER, C.; MÜLLER, W.; HÖRAUF, A.; REUSCH, C.; LUTZ, H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine

granulocytic *Ehrlichia* infection in dogs in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n. 12, p.3460-3462, 1998.

RAVNIK, U.; TOZON, N.; SMRDEL, K.S.; ZUPANC, T.A. Anaplasmosis in dogs: The relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. **Veterinary Microbiology**, v.149, n.1-2, p.172-176, 2011.

RAVNIK, U.; TOZON, N.; STRASEK, K.; AVSIC, ZUPANC, T. Clinical and haematological features in *Anaplasma phagocytophilum* seropositive dogs. **Clinical Microbiology and Infection**, v.2, Suppl 2, p.39-40, 2009.

REMY, V.; HANSMANN, Y.; DE MARTINO, S.; CHRISTMANN, D.; BROUQUI, P. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n.6, p.846-848, 2003.

RIBEIRO, V.L.S., WEBER, M.A., FETZER, L.O. et al. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, p.285-289, 1997.

RICHTER, P.J.; KIMSEY, R.B.; MADIGAN, J.E.; BARLOUGH, J.E.; DUMLER, J.S.; BROOKS, D.L. *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). **Journal Medical Entomology**, v.33, p.1-5, 1996.

RIKIHISA, Y. Cross-reacting antigens between *Neorickettsia helminthoeca* and *Ehrlichia* species, shown by immunofluorescence and Western immunoblotting. **Journal Clinical Microbiology**, v.29, n.9, p.2024-2029, 1991.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, n. 1, p.95-101, 2006.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. 1984. Tribe II. Ehrlichieae Philip 1957, 948A1. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, p.704-711.

RODGERS, S.J.; MORTON, R.J.; BALDWIN, C.A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, n. 2, p.54-159, 1989.

SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S.; MOTA, J.S.; ANDRADE, G.M.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R. Z. Evidência sorológica de anaplasmoze granulocítica equina em equinos do Centro-oeste Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.3, p. 135-140, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^oed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

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 tickborne disease in Portugal. **Veterinary Record**, v.164, p.168-171, 2009a.

SANTOS, A.S.; SANTOS-SILVA, M.M.; SOUSA, R.D.; BACELLAR, F.; DUMLER, J.S. PCR-based serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.9, n.1, p.33-40, 2009b.

SANTOS, A.S.; SANTOS-SILVA, M.M.; ALMEIDA, V.C.; BACELLAR, F.; DUMLER, J.S. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Sebutal District, mainland Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n. 9, p.1643-1648, 2004.

SANTOS, Tiago Marques dos. **Agentes da theileriose e da anaplasmosse granulocítica em eqüídeos de microrregiões do estado do Rio de Janeiro**. 2011. 90p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

SCHOULS, L.M.; VAN, P.I.; RIJPKEMA, S.G.T.; SCHOT, C.S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2215–2222, 1999.

SCORPIO, D.G.; AKKOYUNLU, M.; FIKRIG, E.; DUMLER, J.S. CXCR2 blockade influences *Anaplasma phagocytophilum* propagation but not histopathology in the mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n.5, p.963-968, 2004.

SHAW, S.E.; BINNS, S.H.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J.; SMITHSON, R.; KENNY, M.J. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.157, n. 21, p.645-648, 2005.

SHPYNOV, S.; FOURNIER, P.E.; RUDAKOV, N.; TARASEVICH, I.; RAOULT, D. Detection of members of the general *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p.378-383, 2006.

SKERGET, M.; WENISCH, C.; DAXBOECK, F.; KRAUSE, R.; HABERL, R.; STUENZNER, D. Cat or dog ownership and seroprevalence of ehrlichiosis, Q fever, and cat-scratch disease. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n. 10, p.1337-1340, 2003.

SKOTARCZAK, B.; ADAMSKA, M.; RYMASZEWSKA, A.; SUPROŃ, M.; SAWCZUK, M.; MACIEJEWSKA, A. *Anaplasma phagocytophila* and protozoans of *Babesia* genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland. **Wiadomości parazytologiczne**, v.50, n. 3, p.555-561, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; OSSO, M.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Veterinary Research**, v.37, n. 2, p.231-244, 2006.

STOCKHAM, S.L.; SCHMIDT, D.A.; CURTIS, K.S.; et al. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n. 1, p.63-68, 1992.

STRIK, N.; ALLEMAN, A.R.; BARBET, A.F.; SORENSON, H.L.; WAMSLEY, H.L.; GASCHEN, F.P.; LUCKSCHANDER, N.; WONG, S.; CHU, F.; FOLEY, J.E.; BJOERSDORFF, A.; STUEN, S.; KNOWLES, D.P. Characterization of major surface protein 5 of *Anaplasma phagocytophilum* and the extent of cross-reactivity with *A. marginale*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n. 3, p.262-268, 2007.

STRLE, F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. **International Journal of Medical Microbiology**, v.293, Suppl.37, p.27-35, 2004.

STUEN, S.; BERGSTROM, K.; PETROVEC, M.; VAN DE POL, I.; SCHOULS, L.M. Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after

- experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n. 4, p.692- 695, 2003.
- STUEN, S.; ENGVALL, E.O.; VAN DE POL, I.; SCHOOLS, L.M. Granulocytic ehrlichiosis in a roe deer calf in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, n. 3, p.614-616, 2001.
- SUKSAWAT, J.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n. 1, p.50-55, 2000.
- SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, A.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. Author's correction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 10, p.3887, 2002.
- SUN, W.; IJDO, J.W.; TELFORD, S.R.; HODZIC, E.; ZHANG, Y.; BARTHOLD, S.W.; FIKRIG, E. Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, n. 12, p.3014-3018, 1997.
- TAGLAS, M.B.; FOLEY, J. Differences in transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick species *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis*. **Experimental and Applied Acarology**, v.38, n. 1, p.47-58, 2006.
- TARELLO, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. **Veterinary Record**, v.156, n.24, p. 772-774, 2005.
- TARELLO, W. Canine granulocytic ehrlichiosis (CGE) in Italy. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.51, p.73-90, 2003.
- TATE, C.M.; MEAD, D.G.; LUTTRELL, M.P.; HOWERTH, E.W.; DUGAN, V.G.; MUNDERLOH, U.G.; DAVIDSON, W.R. Experimental infection of whitetailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 8, p.3595-3601, 2005.
- TELFORD, S.R.; DAWSON, J.E.; KATAVOLOS, P.; WARNER, C.K.; KOLBERT, C.P.; PERSING, D.H. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.93, n.12, p.6209-6214, 1996.
- TORINA, A.; CARACAPPA, S. Dog tick-borne diseases in Sicily. **Parassitologia**, v.48, n. 1-2, p.145-147, 2006.
- TUOMI, J. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 3. Immunological strain differences. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v.71, n.1, p.89-100, 1967.
- TUOMI, J.; VON BONSDORFF, C.H. Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. **The Journal of Bacteriology**, v.92, n.5, p.1478-1492, 1966.
- TYZZER, E.E. *Cytoecetes microti*, N.G.H. Sp., a parasite developing in granulocytes and infective for small rodents. **Parasitology**, v.30, p.242-257, 1938.
- UILENBERG, G.; THIAUCOURT, F.; JONGEJAN, F. On molecular taxonomy: What is in a name? **Experimental and Applied Acarology**, v.32, p.301-312, 2004.

- VON, S.L.V.; GÜRTELSCHMID, M.; HANSON, H.S.; GUSTAFSON, R.; DOTEVALL, L.; ENGVALL, E.O.; GRANSTRÖM, M. The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. **Clinical Microbiology Infection**, v.3, p. 573–574, 1997.
- WALLS, J.; GREIG, B.; NEITZE, D.; DUMLER, J.S. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.853-855, 1997.
- WALLS, J.J.; CATUREGLI, P.; BAKKEN, J.S.; ASANOVICH, K.M.; DUMLER, J.S. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group Ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 1, p.354-356, 2000.
- WEBER, R.; PUSTERLA, N.; LOY, M.; LEUTENEGGER, C.M.; SCHÄR, G.; BAUMANN, D.; WOLFENBERGER, C.; LUTZ, H. Serologic and clinical evidence for endemic occurrences of human granulocytic ehrlichiosis in North-Eastern Switzerland. **Schweiz Med Wochenschr**, v.130, n.41, p.1462-70, 2000.
- WEN, B.; CAO, W.; PAN, H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.990, p.45-53, 2003.
- WHITLOCK, J.E.; FANG, Q.Q.; DURDEN, L.A.; OLIVER JR, J. H. Prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from the Georgia Coast and Barrier Islands. **Journal Medical Entomology**, v.37, n.2, p.276–280, 2000.
- WINSLOW, G.M.; BITSAKTSIS, C. Immunity to the ehrlichiae: New tools and recent developments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, n. 3, p.217-221, 2005.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v.87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.
- WOLDEHIWET, Z. Tick-borne fever: A review. **Veterinary Research Communications**, v.6, n. 3, p.163-175, 1983.
- WOLDEHIWET, Z.; SCOTT, G.R. Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.92, p.469-474, 1982.
- WONG, S.J.; THOMAS, J.A. Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic anaplasmosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.1959-1963, 1998.
- WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, p.75-98, 1991.
- WU, T.J.; SUN, H.J.; WU, Y.C.; HUANG, H.P. Prevalence and Risk Factors of Canine Ticks and Tick-Borne Diseases in Taipei, Taiwan. **JVCS**, v. 2, n.3, 2009.
- YOSHIE, K.; KIM, H.Y.; MOTT, J.; RIKIHISA, Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. **Infection and Immunity**, v.68, n.3, p.1125-1133, 2000.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. Ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2004. 1081p.

ZHANG, L.; LIU, Y.; NI, D.; LI, Q.; YU, Y.; YU, X.J.; WAN, K.; LI, D.; LIANG, G.; JIANG, X.; JING, H.; RUN, J.; LUAN, M.; FU, X.; ZHANG, J.; YANG, W.; WANG, Y.; DUMLER, J.S.; FENG, Z.; REN, J.; XU, J. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. **The Journal of the American Medical Association**, v.300, n. 19, p.2263-2270, 2008.

ANEXOS

ANEXO A. Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

ANEXO B. Protocolo de extração de DNA de Carrapato.

ANEXO C. Protocolo de extração de DNA a partir de cultivo células fixadas fixado em lâminas preparadas para Imunofluorescência com auxílio do kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).

ANEXO A: Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: ___/___/___ Propriedade N° _____ Zona: () Rural () Urbana
Localidade: _____ Coord. Geográf.: _____
Proprietário: _____
Endereço: _____
Pt de referência: _____ Temperatura ambiente: _____
Tel: _____ e-mail: _____
Tipo de residência: () pau a pique () alvenaria () madeira () outros:
Há parasitismo por carrapatos em pessoas: () sim () não () já ocorreu
Tipo de vegetação predominante: _____
Quantos cães possui em casa? _____
Pratica alguma ação para controle de carrapato? sim () não () Qual? _____
Leva o cão ao veterinário? sim () não () Qual a Periodicidade? _____
Presença de outras espécies domésticas:
() gatos
() bovinos
() equinos
() outros: Quais?.....
Presença de animais silvestres:
() gambá
() roedores
() outros:Quais? _____
Proprietário informado sobre os riscos das doenças Transmitidas por Carrapatos?
O proprietário conhece alguma doença transmitida por carrapatos? Qual? _____
Nunca ouviu falar () Já ouviu falar () Sabe da relação com o cão () Sabe da relação com o carrapato ()
Conhece algum sintoma () sim () não. Se sim, qual? _____
Proprietário informado sobre os riscos dos carrapatos? () sim () não
Conhece o nome do vetor () Conhece a forma de transmissão ()
Conhece algum caso na localidade de “doença do carrapato” em humanos? () sim () não
Condição econômica (observacional): () baixa () média () alta
Escolaridade:
() Nunca frequentou a escola Primário
() 1° grau incompleto
() 1° grau completo
() 2° grau incompleto
() 2° grau completo
() superior
Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? _____
Utiliza prod. inseticidas no ambiente? () sim () não Quais? _____ Intervalos? _____
Utiliza mét. Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?
() sim () não Quais? _____ Intervalos? _____
Outras obs relevantes: _____

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL Nº _____

Data: ___/___/___ Propriedade Nº _____ Zona: () Rur () Urb Localidade: _____

Proprietário: _____

Nome do animal: _____ Sexo: () Macho () Fêmea Raça: _____

Cor: _____

Animal nascido na propriedade? () sim () não Se não, de onde veio o animal? _____

Há qt tempo está com o animal? _____ Histórico de carrapatos antes: () sim () não

Histórico de carrapatos na vizinhança: () sim () não

Pêlo: () curto () médio () longo

Porte: () peq () méd () grande

Escore: () caquético () magro () normal () obeso

Comportamento: () triste () ativo/normal () agitado

Idade: () <6 meses () 6 meses a 2 anos () 2 a 5 anos () 5 a 10 anos () > 10 anos

Temperatura: _____ Pulso: _____ FR: _____ FC: _____ TPC: _____ Turgor: _____

Mucosa ocular: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Mucosa oral: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Outras alterações sanitárias atuais: _____

Distúrbios atuais de coagulação na pele: () petéquias () equimoses () outros: _____

Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: () sim () não

Animal vive dentro da residência: () sim () não () às vezes

Locais de acesso do animal: () pastagens () córregos () matas () ambiente urbano

Contato direto com outras sp animais: () sim () não Quais? _____

Histórico de patologias anteriores: _____

Animal teve “doença do carrapato”? () sim () não qual? _____

Como diagnosticou? () clinicamente () laboratorialmente () outras

Foi tratado? () sim () não

Tipo de alimentação: () comida () ração () ambos

Possui água e comida à disposição o tempo todo? () sim () não

Vermifugação: () sim () não Há qto tempo? _____ Qual produto? _____

Critério para escolha: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

Possui ectoparasitos? () sim () não

Quais e quantidade?

() pulgas _____

() piolhos _____

() sarnas _____

() carrapatos _____ Fases: _____ espécies: _____

Faz tratamento? () sim () não Qual produto? _____

Se não trata, qual motivo? _____

Critério para escolha do produto:

() indicação

() balconista

() veterinário

() propaganda

Dermatopatias? () sim () não

Sinais de otite? () sim () não

Outros tipos de lesões: _____

Hábito do animal?

() sempre preso

() preso de dia e solto à noite

solto

outros ____

Apresenta abrigo? sim não Tipo: _____

Tipo de ambiente do animal:

cimentado

de terra

gramado

outros

Condição de limpeza do ambiente do animal: ruim moderada satisfatória

Freqde recolhimento e limpeza das fezes:

diariamente 2 a 3 x por sem

1 x por semana

não faz

Tem assist Vet? sim não

Frequência? a cada 6 meses 1 x por ano só qd fica doente

Animal é vacinado? sim não Quais vacinas? _____

Banho: semanal quinzenal mensal outros

Usa produtos parasiticidas? sim não Quais? _____

Outras obs relevantes: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ CPF/RG: _____

_____ endereço: _____

_____, telefone: _____ recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães, autorizo a coleta de material biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ___/___/___ Assinatura:

ANEXO B: Protocolo de extração de DNA de Carrapato

1. Ligue o banho-maria a 62,5°C. Prepare três conjuntos idênticos de tubos devidamente identificados.
2. Para cada extração serão utilizados 700 µL de tampão de extração. Calcule a quantidade total necessária de tampão de extração com alguns mililitros a mais para segurança. Adicione 2-mercaptoetanol à quantidade necessária de tampão na proporção de 2 µL de 2-mercaptoetanol para cada mililitro de tampão de extração. Mantenha o tampão de extração aquecido em banho-maria a 62,5 °C.
3. Pese 50 a 100 mg de tecido de carrapato diretamente dentro do microtubo.
4. Mergulhe o microtubo contendo o tecido de carrapato dentro de um recipiente contendo nitrogênio líquido e espere até que o tecido fique bem congelado (crocante) antes de iniciar a maceração.
5. Dentro de um microtubo de 2,0mL macere o tecido utilizando um bastão de vidro por uns 20 a 40 segundos até o tecido se mostrar bem pulverizado. Ao tecido recém macerado adicione 700 µL de tampão de extração.
6. Misture o tecido no tampão com o auxílio do vortex. Incube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 62,5 °C por um mínimo de 60 minutos. Esta incubação pode se prolongar até 90 minutos. Durante a incubação agite os tubos a cada 15 minutos para homogeneizar a suspensão.
7. Retire os tubos do banho-maria. Deixe-os esfriar. Em capela de exaustão, faça a primeira extração com solvente orgânico adicionando 600 µL de CIA (Clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea.
8. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima 18.000xg durante 5 minutos.
9. Retire os tubos da centrifuga cuidadosamente. Evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas, pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo (~500 µL).
10. A fase aquosa no novo tubo adicione 1/5 do volume (~100 µL) de uma solução 5% CTAB, 0.7M NaCl. Misture bem durante 5 minutos até homogeneizar a solução. Repita a extração com 600 µL de CIA (Passos 7, 8 e 9) Retire novamente a fase aquosa superior e transfira-a para um novo tubo.
11. Adicione 2/3 do volume da solução aquosa (~400 µL) de isopropanol frio (-20°C). Misture gentilmente para precipitar os ácidos nucleicos. Se o precipitado não for visível, coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais.
12. Este é um ponto adequado para parar o procedimento de extração se não for possível continuar no mesmo dia.
13. Centrifugue os tubos a 12.000xg em microcentrífuga durante 5 minutos, para formar um *pellet*. Se o *pellet* não for visível coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais, e centrifugue novamente.
14. Gentilmente descarte o máximo possível de sobrenadante sem perder o *pellet*. Este em geral será difuso e solto e estará no fundo ou ao longo da parede do tubo dependendo do ângulo do rotor utilizado.

15. Lave o *pellet* com 1 mL de etanol 70%. Deixe o *pellet* imerso por 5 a 10 minutos. Geralmente o *pellet* fica mais branco a este ponto. Retire o etanol 70%.
16. Lave o *pellet* uma vez em 1 mL de etanol 95% (ou etanol absoluto) durante 2 a 3 minutos. Retire o máximo possível de etanol por capilaridade ou mesmo usando a pipeta. Deixe o *pellet* secar ao ar durante alguns minutos se possível em fluxo laminar, ou seque-os em centrífuga a vácuo.
17. Ressuspenda o *pellet* em 25 a 100 μ L (dependendo do seu tamanho) de tampão TE contendo 10 μ g/mL de RNase A. Incube a 37°C por 30 a 120 minutos para a digestão de RNA.

ANEXO C: Protocolo de extração de DNA a partir do substrato antigênico presente em lâminas preparadas para Imunofluorescência com auxílio do kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).

A. phagocytophilum (cultivado em células de Linfoma Humano-LH60) – duas lâminas

N. risticii (cultivado em células DH82) - duas lâminas

R. rickettsii (cultivado em células Vero-76) - duas lâminas

- 1- Remova as células fixadas na lâmina com o auxílio de uma agulha 21 x 0,8mm estéril.
- 2- Em ambiente fechado, lave cada poço da lâmina com 8 μ L de tampão PBS (KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 1,47mM, NaCl 136,89mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, pH 7,4) e coloque a suspensão em um microtubo de 1,5 mL. Todos os poços das lâminas deverão ser lavados até um volume máximo de 200 μ L.
- 3- Ao tubo de 1,5mL contendo a suspensão de celular, adicione 20 μ L de proteinase K. Misture no vortex por 10s e incube a 56 °C por 25 minutos. (Obs: Esse tempo pode ser prorrogado até as células estarem completamente lisadas)
- 4- Vortex por 15 s. Adicione 200 μ L de tampão AL na amostra. Misture vigorosamente no vortex. Em seguida adicione 200 μ L de etanol 100%. Misture novamente no vortex vigorosamente.
- 5- Pipete a mistura em uma coluna (DNeasy mini spin) acoplada em um microtubo coletor de 2,0mL. Centrifugue a 6000xg por 1 minuto. Descarte o tubo coletor juntamente com o líquido.
- 6- Coloque a coluna em um novo microtubo coletor de 2,0mL. Adicione na coluna 500 μ L do tampão AW1. Centrifugue por 1 minuto a 6000xg. Descarte o tubo coletor juntamente com o líquido.
- 7- Coloque a coluna em um novo microtubo coletor de 2,0mL. Adicione na coluna 500 μ L do tampão AW2. Centrifugue por 3 minutos a 20.000xg. Descarte o tubo coletor juntamente com o líquido.
- 8- Transfira a coluna para um novo microtubo do tipo eppendorf de 1,5mL e adicione 50 μ L do tampão AE para a eluição. Incube por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue por 1 minuto a 6000xg.
- 9- Repita o passo 8 duas vezes.
- 10- Faça alíquotas das amostras e congele o DNA a - 20°C até o momento das análises moleculares.