

ANDRÉS MAURICIO ORTEGA OROZCO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES ATENDIDOS
NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA -
VIÇOSA/MG**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES ATENDIDOS
NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA -
VIÇOSA/MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2018.



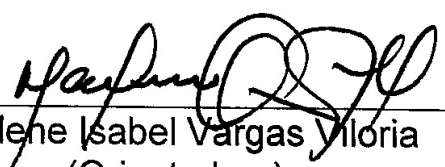
Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo
(Coorientador)



Aécio Carlos de Oliveira



Leandro Abreu da Fonseca



Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Orientadora)

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

O77d
2018 Ortega Orozco, Andrés Mauricio, 1989-
Detecção molecular de hemoparasitos em cães atendidos no
Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa -
Viçosa/MG / Andrés Mauricio Ortega Orozco. – Viçosa, MG,
2018.

ix, 58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 36-55.

1. *Anaplasma phagocytophilum*. 2. Parasitologia
veterinária. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Zoonoses.
5. Cão - Doenças. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.7089696

ANDRÉS MAURICIO ORTEGA OROZCO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CÃES ATENDIDOS
NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA -
VIÇOSA/MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Conhecimento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por fazer tudo possível.

A minha família, especialmente ao meu pai Calixto, minha mãe Zulma, aos meus irmãos Jorge e Fabian e minhas cunhadas Alana e Gloria, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao Departamento de Veterinária e ao programa de pós-graduação da Universidade Federal de Viçosa, por me receber como estudante e apoiar minha formação profissional.

À professora Marlene Isabel Vargas e ao professor Joaquín Patarroyo, por serem meus orientadores e ter me recebido na UFV. Muito obrigado pela confiança e o apoio!

Aos funcionários e técnicos, especialmente ao pessoal do laboratório de análises clínicas do DVT: Aécio, por ser meu co-orientador, Lucinda, Aloísio, Luiz Marcio e Toninho, pelos ensinamentos e o bom ambiente de trabalho.

À professora Júlia Gonçalves da Silveira, pela orientação, disposição e paciência no laboratório de protozoologia veterinária da UFMG e a Andreia, Andreina, Anna, Brunna, Fernanda e ao Hudson pela colaboração fundamental nas atividades do laboratório: “vai dar certo!”

À Adriana, por ser aquela pessoa importante e especial pra mim que sempre tem a palavra certa no momento certo.

Ao professor Leandro, Fabrícia e ao grupo do Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária, por serem meus amigos e que os nossos futuros projetos sejam sempre de qualidade.

Aos médicos veterinários residentes, em especial a Diana pela ajuda recebida.

À Rosi pela ajuda, indicações, carinho e paciência para resolver as coisas da pós-graduação.

À Mariana Drummond e família, a Marina Weitzel e família e ao Bráulio, por me receberem em Belo Horizonte onde não conhecia ninguém e me brindar com suas amizades.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta neste trabalho e na minha formação profissional, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	2
2.1.1. Etiologia	2
2.1.2. Vetores	3
2.1.3. Reservatórios.....	3
2.1.4. Transmissão	5
2.1.5. Patogênese.....	5
2.1.6. Sinais clínicos e achados laboratoriais	8
2.1.7. Diagnóstico	10
2.1.8. Tratamento	12
2.1.9. Importância na Saúde pública	12
2.2. Outros hemoparasitas	14
2.2.1. <i>Ehrlichia canis</i>	14
2.2.2. <i>Anaplasma platys</i>	15
2.2.3. <i>Babesia canis</i>	15
2.2.4. <i>Hepatozoon canis</i>	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Comissão de ética	18
4.2. Local de processamento das amostras	18
4.3. Amostras	18

4.4. Processamento das amostras	19
4.5. Extração de DNA.....	19
4.6. Reação em cadeia da polimerase	19
4.7. Purificação dos produtos	21
4.8. Encaminhamento das amostras para sequenciamento.....	22
4.9. Análises estatísticas	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	28
6.1 Detecção molecular.....	28
6.1.1 <i>A. phagocytophilum</i>	28
6.1.2 <i>E. canis</i>	30
6.1.3 <i>A. platys</i>	31
6.1.4 <i>Babesia</i> e <i>Hepatozoon</i>	32
6.2 Alterações hematológicas	32
7. CONCLUSÕES	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO 1	56
ANEXO 2	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Alterações fisiopatológicas de doença na infecção por hemoparasitoses	8
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1%.	24
Figura 3. Alinhamento da sequencia obtida com o alvo 16S rRNA de <i>A. phagocytophilum</i> através do aplicativo Blast®	24
Figura 4. Alinhamento da sequência obtida com o alvo 16S rRNA de <i>A. platys</i> através do aplicativo Blast®	26
Figura 5. Inclusão intraplaquetaria sugestiva de <i>A. platys</i>	26

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Pequenos mamíferos como reservatórios competentes de <i>A. phagocytophilum</i> nos Estados Unidos.....	4
Tabela 2. Sinais clínicos detectados com maior frequência em um grupo de cães com anaplasmoses granulocítica canina	9
Tabela 3. Vantagens e desvantagens nos métodos diagnósticos em doenças transmitidas por carrapatos em cães	12
Tabela 4. Condição da nPCR utilizada nas diferentes reações	20
Tabela 5. Sequência de primers utilizados para identificação de <i>A. phagocytophilum</i> e outros hemoparasitas.....	20
Tabela 6. Programação do termociclador automático para realização da nPCR.....	21
Tabela 7. Condição para o processo de purificação das amostras.....	21
Tabela 8. Condição para o envio de amostras para sequenciamento.....	22
Tabela 9. Número de amostras positivas para cada primer empregado na nPCR dos cães avaliados.	23
Tabela 10. Hemoparasitas identificados nas amostras processadas e número de cães positivos.....	24
Tabela 11. Valores médios dos índices hematológicos de animais positivos exclusivamente para um tipo de primer e dos animais negativos.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT: Alanina aminotransferase.
- AST: Aspartato aminotransferase.
- CD8+: Linfócito T citotóxico.
- CGA: Anaplasnose granulocítica canina.
- CID: Coagulação intravascular disseminada.
- CK: Creatina quinase.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- DVT: Departamento de Veterinária.
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.
- ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática
- FA: Fosfatase alcalina.
- HGA: Anaplasnose granulocítica humana.
- HL60: Células de leucemia promielocítica humana
- IFA: imunofluorescência.
- IFN- γ : Interferão-gama.
- IL-10: Interleucina 10.
- IL-4: Interleucina 4.
- NK: Células exterminadoras naturais
- NKT: Linfócito T natural killer
- nPCR: Reação em cadeia da polimerase nested ou anidada.
- PCR: Reação em cadeia da polimerase.
- PMNs: Polimorfonucleares.
- PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1.
- RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real.
- Th-1: Linfócito T helper 1.
- Th-2: Linfócito T helper 2.
- UFV: Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

OROZCO, Andrés Mauricio Ortega, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Detecção molecular de hemoparasitos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa - Viçosa/MG.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Coorientador: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

Neste estudo foram analisadas 100 amostras de sangue de cães, com trombocitopenia marcada (plaquetas < 100.000/ μ L) ou com visualização direta de hemoparasitas (ou inclusões compatíveis) no esfregaço sanguíneo, obtidas da rotina do laboratório de análises clínicas do DVT (Departamento de Veterinária), do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As amostras foram submetidas à extração de DNA e posteriormente à reação em cadeia da polimerase de tipo nested (nPCR), para o diagnóstico molecular de *A. phagocytophilum* e outros hemoparasitas. Do total das amostras, 60 foram positivas para no mínimo um hemoparasita. Foi possível detectar a presença de quatro gêneros de hemoparasitas nas amostras de sangue avaliadas: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia* e *Hepatozoon*. Foram amplificadas um total de 26 produtos do primer *Ehrlichia spp* monocítica, 23 de *Ehrlichia spp granulocítica* 26 com BAB-rum e 10 utilizando o hsp70. Logo ao analisar os resultados, de um total de 86 amostras foi possível identificar os seguintes hemoparasitas: 23 *E. canis* (identidade 94%-100%), 7 *A. platys* (identidade 97%-100%), 11 *B. vogeli* (identidade 86%-99%) e 15 *H. canis* (identidade 94%-99%). Nenhuma amostra foi positiva utilizando o primer msp4, específico de *A. phagocytophilum*, porém, o sequenciamento de uma das amostras amplificadas teve uma identidade de 99% com um fragmento da sequência parcial do gene 16S rRNA de *A. phagocytophilum* depositada no GenBank. A não amplificação de produtos com um primer específico para *A. phagocytophilum* pode ser atribuída a diversas hipóteses, mas isto não exclui a possibilidade que a bactéria esteja presente no município de Viçosa ou da microrregião.

ABSTRACT

OROZCO, Andrés Mauricio Ortega, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Molecular detection of hemoparasites in dogs treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa - Viçosa/MG.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-adviser: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

In this study were analyzed blood samples from 100 dogs, with marked thrombocytopenia (platelets/ μL < 100,000) or with direct visualization of hemoparasites (or compatible inclusions) in the blood smear, obtained from the routine of the clinical analysis laboratory, of the DVT (Veterinary Department), from the Veterinary Hospital da Universidade Federal de Viçosa (UFV). The samples were submitted for DNA extraction and subsequently to polymerase chain reaction of nested type (nPCR), for the molecular diagnosis of *A. phagocytophilum* and other hemoparasites. From all the samples, 60 were positive for at least one hemoparasite. It was possible to detect the presence of four genera of hemoparasites in the blood samples assessed: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia* and *Hepatozoon*. Were amplified a total of 26 products from the monocytic *ehrlichia spp* primer, 23 from the granulocytic *ehrlichia spp* primer, 26 with BAB-rum primer and 10 using the hsp70 primer. After analyzing the results, from a total of 85 it was possible to identify the following hemoparasites: 23 *E. canis* (identity 94%-100%), 7 *A. platys* (identity 97%-100%), 11 *B. vogeli* (identity 86%-99%) and 15 *H. canis* (94% -99% identity). No samples were positive using the msp4 primer, specific for *A. phagocytophilum*, however, the sequence of one of the amplified samples had a 99% identity with a partial sequence of the 16S rRNA gene of *A. phagocytophilum* deposited on GenBank. The non-amplification of products with a specific primer for *A. phagocytophilum* can be attributed to several hypotheses, but this does not exclude the possibility that the bacterium is present in the municipality of Viçosa or in the microregion.

1. INTRODUÇÃO

Anaplasma phagocytophilum (*A. phagocytophilum*) é uma bactéria zoonótica, Gram negativa, intracitoplasmática obrigatória, e pertencente à família *Anaplasmatatacae*, ordem *Rickettsiales* (DUMLER et al., 2001). É o agente causal da anaplasmoze granulocítica humana (HGA) e canina (CGA) (DUMLER et al., 2005), sendo considerado um patógeno emergente de distribuição mundial que também infecta os cães, cavalos e outras espécies (CARRADE et al., 2009). Os vetores conhecidos são carrapatos pertencentes ao complexo *Ixodes persulcatus* (WOLDEHIWET, 2010). Pesquisas recentes relatam o interesse em conhecer a importância de *Amblyomma* sp. e *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus sensu lato*) na transmissão de *A. phagocytophilum* em cães no Brasil (SANTOS et al., 2013; SILVEIRA et al., 2017).

Microscopicamente *A. phagocytophilum* é caracterizado como um corpo de inclusão intracitoplasmático observado em neutrófilos. Os pacientes infectados podem apresentar leucopenia e um reduzido número de células são infectadas (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Porém, no esfregaço sanguíneo é morfológicamente indistinguível da *Ehrlichia ewingii* (*E. ewingii*), o agente etiológico da *Erlíquiose granulocítica* canina (OLIVEIRA et al., 2009) o que confere uma baixa sensibilidade a esta técnica.

Entretanto, a utilização de testes comerciais (ELISA) não é recomendada devido a uma possível reação cruzada com *Anaplasma platys* (*A. platys*) (CHANDRASHEKAR et al., 2010). Isto leva a considerar que métodos diagnósticos mais sensíveis como a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) sejam mais adequados para o diagnóstico de *A. phagocytophilum* (AGUERO-ROSENFELD, 2002).

Atendendo ao risco zoonótico e a presença dos vetores em ambientes urbanos e rurais, o objetivo deste trabalho foi detectar molecularmente a presença de *A. phagocytophilum* e outros hemoparasitas em um grupo cães naturalmente infectados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Anaplasma phagocytophilum*

A. phagocytophilum foi conhecido como o agente etiológico em ovelhas e bovinos, sendo identificada como *Rickettsia phagocytophila* (FOGGIE, 1949). Posteriormente, denominou-se *Cytoecetes phagocytophila* e *Cytoecetes microti* (TYZZER, 1938; FOGGIE, 1962).

Depois foi classificada dentro do gênero *Ehrlichia*, porém como espécies separadas. Na *Erliquiose granulocítica* equina (hoje *anaplasose granulocítica* equina) foi descrita como *Ehrlichia equi* (GRIBBLE, 1970). Em ruminantes foi denominada *Ehrlichia phagocytophila* (RISTIC; HUXSOLL, 1984) e em humanos como o agente da *Erliquiose granulocítica* humana (EGH) (CHEN et al., 1994). A partir de estudos nos genes 16S rRNA, groESL e da expressão de proteínas na superfície de membranas dos agentes das famílias *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae*, estas foram reconhecidas como um único agente: *A. phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001).

2.1.1. Etiologia

A. phagocytophilum é uma bactéria Gram negativa, intracitoplasmática obrigatória, que infecta as células mielóides da linhagem granulocítica (principalmente neutrófilos, ocasionalmente eosinófilos) e raramente agranulócitos (monócitos) (WOLDEHIWET, 1987; DUMLER et al., 2001; CARRADE et al., 2009). Experimentalmente foi observado que tem a capacidade de infectar precursores medulares das células sanguíneas (KLEIN et al., 1997).

Sua forma intracitoplasmática é caracterizada como polimórfica (cocóide ou elipsoidal) formando microcolônias chamadas mórulas ou vacúolo parasitóforo com um diâmetro aproximado de 1.5 μm a 2.5 μm (DUMLER et al., 2001; SEVERO et al., 2015).

2.1.2. Vetores

A. phagocytophilum é transmitida por carrapatos do complexo *Ixodes persulcatus* e na Europa o *Ixodes ricinus* é o principal vetor (WOLDEHIWET, 2010), mas também existem relatos de *Ixodes trianguliceps* (BOWN et al., 2008); na Ásia, *Ixodes persulcatus* é o principal vetor (CAO et al., 2000), assim como *Ixodes ricinus*, *Ixodes ovatus* (OHASHI et al., 2005; MASUZAWA et al., 2008); nos Estados Unidos, *Ixodes scapularis* (HODZIC et al., 1998) e *Ixodes pacificus* são os principais vetores (RICHTER et al., 1996).

Entretanto no Brasil o primeiro relato de *A. phagocytophilum* se deu no estado de Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2011). Todavia não há relato da presença de vetores pertencentes ao gênero *Ixodes persulcatus*, porém há relatos em cinco carrapatos da espécie *R. sanguineus* e um de *Amblyomma cajennense* (SANTOS et al., 2013). A capacidade destes e outros tipos de carrapatos se comportarem como vetor competente deve ser avaliada.

2.1.3. Reservatórios

A. phagocytophilum mantém um ciclo entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, onde participam espécies de pequeno, médio e grande porte, divergindo entre domésticos e selvagens. No entanto podemos ressaltar que os roedores, alguns pequenos mamíferos e ruminantes são importantes reservatórios naturais de *A. phagocytophilum*.

Espécies como *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Sorex araneus*, *Myodes glareolus*, *Erinaceus europaeus* (LIZ et al., 2000; SILAGHI et al., 2012). Entre os cervídeos, a orça (*Capreolus capreolus*) é amplamente reconhecida como reservatório, assim como o veado-vermelho (*Cervus elaphus*) (ALBERDI; WALKER; URQUHART, 2000; POLIN et al., 2004; STEFANIDESOVA et al., 2008; SILAGHI et al., 2011). Na Ásia, o rato do campo listrado (*Apodemus agrarius*) é um dos roedores reconhecidos como hospedeiros, assim como os ruminantes (ovelhas, cabras) e animais selvagens (CHAE et al., 2008; ZHAN et al., 2010).

Nos Estados Unidos, o camundongo de patas brancas (*Peromyscus leucopus*) é conhecido como reservatório do microrganismo (TELFORD et al., 1996). Quanto aos ruminantes, acreditava-se que o Cariacu (*Odocoileus virginianus*) era o hospedeiro natural de *A. phagocytophilum*, mas experimentalmente evidenciou-se que existia uma variante da bactéria (AP-Variante 1) muito menos virulenta que é incapaz de infectar camundongos e que portanto este animal não seria reservatório para infecções em humanos (MASSUNG et al., 2003; WOLDEHIWET, 2010). Outros pequenos mamíferos também classificados como reservatórios estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Pequenos mamíferos como reservatórios competentes de *A. phagocytophilum* nos Estados Unidos.

Hospedeiro mamífero	Nome comum
<i>Blarina brevicauda</i>	Musaranho de cauda curta
<i>Didelphis virginiana</i>	Gambá da virgínia
<i>Glaucomys volans</i>	Esquilo voador do sul
<i>Mephitis mephitis</i>	Cangambá
<i>Procyon lotor</i>	Guaxinim
<i>Sciurus carolinensis</i>	Esquilo-cinzentos
<i>Sorex cinereus</i>	Musaranho ciríneo
<i>Tamias striatus</i>	Esquilo do este
<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	Esquilo vermelho americano

Fonte: KEESING et al., (2012).

Devido a capacidade de se movimentar entre um lugar e outro e ao risco de transportar e disseminar vetores, bactérias e outros microrganismos patogênicos, a importância epidemiológica das aves como reservatórios, também tem sido estudada. Em pesquisas realizadas no Brasil detectaram DNA de *A. phagocytophilum* no sangue em um Carcará (*Caracara plancus*) e em dois urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*) o que sugere que estas espécies poderiam atuar como possíveis reservatórios (MACHADO et al., 2012).

2.1.4. Transmissão

A transmissão do patógeno desde os vetores até o hospedeiro ocorre no momento da alimentação. A fim de elucidar a transmissão de *A. phagocytophilum* pesquisas foram desenvolvidas para determinar o tempo aproximado em que a infecção acontece. Determinou-se um tempo mínimo de 24 horas para que larvas de *Ixodes scapularis* se infectassem com o agente e em forma de ninfas infectadas (transmissão transestadial) eram capazes de transmitir a bactéria em aproximadamente 40 - 48 horas a camundongos (HODZIC et al., 1998).

2.1.5. Patogênese

A patogênese da CGA não é bem compreendida e ainda existem muitos questionamentos que devem ser esclarecidos. Quando o carrapato se alimenta do hospedeiro, as secreções resultantes produzem trauma vascular e lesões aos tecidos como consequência da resposta imune associada, onde neutrófilos e outros polimorfonucleares (PMNs) serão atraídos e secretarão quimiocinas que estimularão a produção de quimiotáticos de granulócitos por parte das células endoteliais (TATCHELL; MOORHOUSE, 1970; MUNDERLOH et al., 2004).

A bactéria adere-se ao neutrófilo através de moléculas de adesão que estão na superfície celular, como a P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), permitindo a endocitose facilitada por balsas lipídicas especializadas (LIN; RIKIHISA, 2003; CARRADE et al., 2009). A proteína maior de superfície msp2 (p44) de *A. phagocytophilum* foi relacionada a adesão da bactéria ligando-as nas células hospedeiras (PARK; CHOI; DUMLER, 2003).

Os neutrófilos possuem uma série de proteínas e espécies reativas de oxigênio para eliminar os patógenos. Para evadir estes mecanismos de defesa, os microrganismos têm uma série de mecanismos para garantir sua sobrevivência. Em um estudo realizado com células HL-60 infectadas com *A. phagocytophilum*, observou-se que ocorre uma falha na maturação do fagossomo a partir da adição de certas partículas e moléculas na via endocítica, impedindo sua união com o lisossomo evitando a sua degradação enzimática no processo de autofagia (WEBSTER et al., 1998);

RIKIHISA, 2011). Assim provavelmente *A. phagocytophilum* poderia sintetizar proteínas inibitórias de vida curta que afetariam a NADPH oxidase e a consequente geração de superóxidos (STRINGER; EDWARDS, 1995; SCAIFE et al., 2003).

Normalmente os neutrófilos têm uma vida média curta na circulação que é de aproximadamente 6 – 10 horas com ligeiras variações entre espécies (THRALL, 2007). Por tanto, para garantir sua replicação nestas células, *A. phagocytophilum* deve aumentar este tempo de vida. A hipótese sobre o atraso da apoptose em neutrófilos foi avaliada e confirmada *in vivo* em ovinos. Adicionalmente foi evidenciado um aumento da explosão respiratória (também denominada explosão oxidativa) e diminuição da quimiotaxia (SCAIFE et al., 2003).

Existem outras estratégias que *A. phagocytophilum* utiliza no processo de infecção celular. A remodelação do citoesqueleto através da reorganização da actina produziria estruturas celulares mais irregulares, o que facilitaria a infecção da célula (AYLLÓN et al., 2013); o conjunto das proteínas maiores de superfície teria funções importantes na geração de diversidade antigênica, manipulação da cromatina nuclear entre outras (DE LA FUENTE et al., 2005, 2016). A capacidade de inibir a resposta inata é através da desregulação de vários genes que codificam proteínas para a eliminação de bactérias através da sínteses de peptídeos antimicrobianos e outras moléculas. Todos estes mecanismos podem acontecer tanto na célula do hospedeiro invertebrado como do vertebrado (DE LA FUENTE et al., 2016).

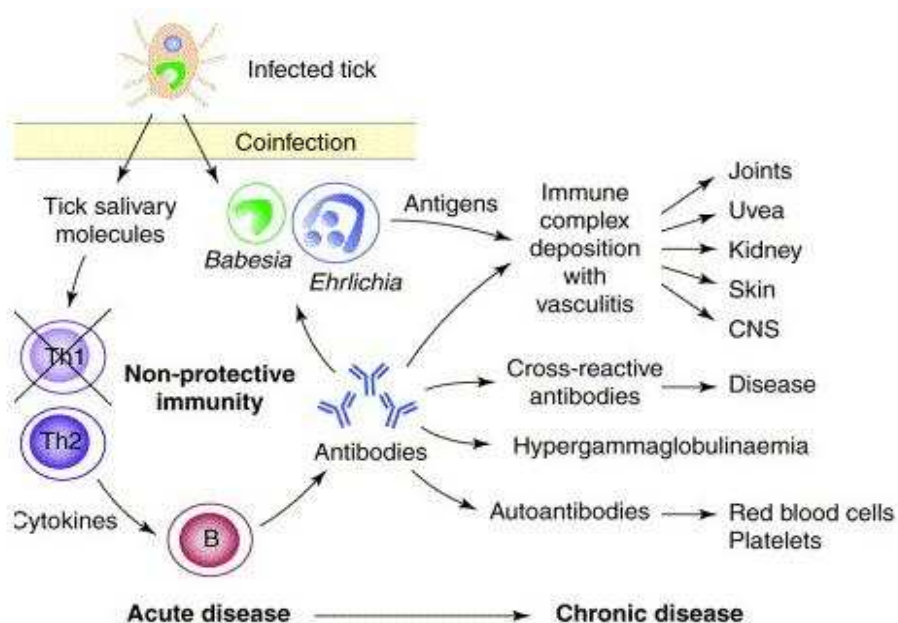
É desconhecido o local onde a bactéria se replica depois que penetra a pele no momento da alimentação do carrapato até o período bacterêmico (WOLDEHIWET, 2010). Acredita-se que as células do endotélio sejam o sitio de relevância na replicação inicial deste e outros microrganismos. Este processo já foi demonstrado em condições *in vitro*, pois *A. phagocytophilum* conseguiu infectar células endoteliais de bovinos, macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) e humanas (MUNDERLOH et al., 2004) assim como células do coração e fígado de camundongos. Esses achados sugerem a importância das células endoteliais na patogênese da infecção (HERRON et al., 2005). Assim, as células do endotélio seriam chave para transferir *A.*

phagocytophilum aos neutrófilos (MUNDERLOH et al., 2004). Uma vez infectados por *A. phagocytophilum*, os neutrófilos diminuem a capacidade de aderir-se as células endoteliais, pois a expressão de PSGL-1 e L-selectina é reduzida (CARRADE et al., 2009).

O conjunto destas situações levaria a uma alteração no processo de diapedese, evitando a transmigração celular e manteria os neutrófilos ativados na circulação o que agravaria o processo inflamatório. Da mesma forma, devido a incapacidade de transmigrar aumentaria o risco de infecções secundárias oportunistas (CHOI et al., 2003; CARRADE et al., 2009).

Durante infecções por microrganismos, respostas imunes tanto celulares como humorais são induzidas com o fim de dar resolução ao processo. Um estudo em pacientes humanos infectados com *A. phagocytophilum*, na fase aguda da doença foi observado aumento nos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-10 e IL-4, similar a resposta de tipo Th-1 (WORMSER et al., 2000). O IFN- γ incrementa a expressão de moléculas MHC e induz uma resposta eficiente frente a patógenos intracelulares (MOSER; LEO, 2010) porém, esta mesma pode produzir prejuízos ao organismo. *A. phagocytophilum* tem mecanismos para evadir esta resposta, mas de qualquer forma, os efetores desta via são ativados produzindo lesões inflamatórias Isto foi evidente quando em camundongos infectados com a bactéria observou-se que uma expansão significativa de células NK e CD8⁺ estavam associados a inflamação hepática severa, onde possivelmente poderia haver uma grande infiltração de células NKT no órgão. Esses achados sugerem a grande importância da resposta inata como indutora de lesões inflamatórias imunomediada nos indivíduos infectados por *A. phagocytophilum* e outros hemoparasitas (Figura 1) (SHAW et al., 2001; SCORPIO et al., 2006; CHOI et al., 2007).

Figura1. Alterações fisiopatológicas de doença na infecção por hemoparasitoses.



Fonte: (SHAW et al., 2001).

2.1.6. Sinais clínicos e achados laboratoriais

Em cães infectados os sinais clínicos geralmente são inespecíficos. As principais alterações descritas em 26 cães soropositivos para *A. phagocytophilum* estão na tabela 2. Em outras espécies domésticas podem aparecer piroxia, síndrome respiratório, redução na produção de leite e aborto (SEVERO et al., 2015).

Tabela 2. Sinais clínicos detectadas com maior frequência em um grupo de cães com anaplasmosse granulocítica canina.

Sinal clínico	No de cães
Letargia	21
Inapetência	15
Claudicação	13
Febre	12
Linfadenomegalia	5
Derrame articular	5
Vômito	4
Esplenomegalia	3
Hepatomegalia	2
Tosse	2
Epistaxe	2

Fonte: MAZEPA et al., 2010

Outras alterações são mucosas hipocoradas, taquicardia e taquipneia, diarreia (as vezes com fezes melênicas) e petéquias (KOHN et al., 2008; GRANICK; ARMSTRONG; BENDER, 2009; MAZEPA et al., 2010). Na hematologia e bioquímica sanguínea anormalidades próprias de infecção por hemoparasitas são identificadas. Nos hemogramas a trombocitopenia é o achado mais comum em 90% dos casos. Anemia (regenerativa ou não) e neutropenia são também descritos com certa frequência, também podendo existir leucocitose, neutrofilia, (as vezes com desvio à esquerda regenerativo), linfopenia, monocitose, hiperproteinemia plasmática, e aglutinação de hemácias, o que em conjunto com aumento nos tempos de coagulação seriam achados compatíveis com coagulação intravascular disseminada (CID) (KOHN et al., 2008; CARRADE et al., 2009; GRANICK; ARMSTRONG; BENDER, 2009).

Alguns estudos indicam injúria hepática devido aos mecanismos inflamatórios implicados nestes casos. Segundo Scorpio et al. (2006) e Choi et al., (2007), em infecções por *A. phagocytophilum*, histologicamente é possível evidenciar lesões parenquimatosas dispersas, hepatite lobular,

lesões focais com infiltrados inflamatórios mistos e hepatócitos apoptóticos, infiltrados granulomatosos e edema. Estas lesões produziram alterações na bioquímica clínica relacionadas a estrutura e função do fígado em indivíduos infectados. Tem-se relatado aumento na atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), hiperproteinemia por hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia, assim como hipocalcemia. (KOHN et al., 2008; GRANICK; ARMSTRONG; BENDER, 2009; MAZEPA et al., 2010).

Em animais nos qual foi possível a realização da urinálise foi descrita desde isostenúria até hiperstenúria e hematúria (GRANICK; ARMSTRONG; BENDER, 2009; MAZEPA et al., 2010). Tem se relatado proteinúria com discreto aumento da relação proteína/creatinina urinária em um caso (KOHN et al., 2008).

2.1.7. Diagnóstico

Devido à inespecificidade dos sinais clínicos, alterações laboratoriais e presença de co-infecções o diagnóstico da anaplasmoose granulocítica pode ser um desafio (WOLDEHIWET, 2010). Considerando isto, o uso de testes diagnósticos é de grande importância. Estes podem ser classificados como métodos diretos e indiretos (AGUERO-ROSENFELD, 2002).

Entre os métodos diretos o hemograma faz parte da rotina no laboratório de análises clínicas. Esta técnica permite a visualização direta do microrganismo no esfregaço de sangue, embora seja uma ferramenta que apresenta baixa sensibilidade e especificidade (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Apesar de ser uma bactéria Gram negativa, a coloração de Gram não funciona muito bem, e a sua visualização é melhor com colorações tipo Romanowsky (WOLDEHIWET, 2010). O tempo em que a mórula pode ser visualizada no citoplasma de neutrófilos no esfregaço de sangue pode variar entre 4 – 21 dias, sendo um período curto de bacteremia (WINJUM; RILEY, 1993; EGENVALL et al., 1998). A porcentagem de neutrófilos com inclusões citoplasmáticas pode variar entre 1,2%-8% (WINJUM; RILEY, 1993; KIRTZ et al., 2005). Além disso, deve ser considerada a presença de *E. ewingii*,

morfologicamente similar, um agente já reportado no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009).

A cultura celular é outro método de diagnóstico direto. Em condições *in vitro*, a bactéria pode ser cultivada em células IDE8 (MUNDERLOH et al., 1996), células da linha HL-60 (GOODMAN et al., 1996); células progenitoras da medula óssea (KLEIN et al., 1997) e células endoteliais de macaca mulatta, seres humanos e bovinos (MUNDERLOH et al., 2004).

A PCR é considerada um método de diagnóstico molecular com grande sensibilidade e especificidade nas infecções agudas. Normalmente as sequências alvo para amplificação são aquelas relacionadas com segmentos do genes 16S rRNA, *groESL*, *epank-1* e genes que codificam antígenos de 44 kDa (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Diversos tipos de PCR (nPCR e RT-PCR) tem sido empregados com sucesso na identificação de *A. phagocytophilum* no sangue de cães infectados (MASSUNG et al., 1998; EGENVALL et al., 2000; KIRTZ et al., 2005; SANTOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015). Entretanto, a PCR pode apresentar variações na detecção, especificidade e amplificação de produtos não específicos o que pode atrapalhar os resultados obtidos (MASSUNG; SLATER, 2003).

Como métodos indiretos de diagnóstico podem ser empregados métodos sorológicos, tais como imunofluorescência (IFA) indireta e testes tipo ELISA (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Usando a técnica de IFA foi observada prevalência de 4%-54% nos cães avaliados (SANTOS et al., 2009; KOHN et al., 2011; EBANI et al., 2014) e com ELISA detectaram anticorpos em 5%-25% (VILLENEUVE et al., 2006; BEALL et al., 2008; VIEIRA et al., 2012).

Uma limitação importante com os testes indiretos é a ocorrência de reação cruzada de antígenos ou anticorpos com microrganismos que sejam geneticamente próximos. Isso foi comprovado quando em um estudo realizado para avaliar o desempenho de um teste ELISA comercial, anticorpos de cães experimentalmente infectados com *A. platys* reagiram com o analito para anticorpos de *A. phagocytophilum* (CHANDRASHEKAR et al., 2010). Um resumo dos benefícios e limitações dos métodos diagnósticos em doenças transmitidas por carrapatos está indicado na tabela 3.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens nos métodos diagnósticos em doenças transmitidas por carrapatos em cães.

MÉTODO DIAGNOSTICO	VANTAGEM	DESVANTAGEM
Esfregaço sanguíneo	Rápido e pode ser realizado na clínica; a visualização do microrganismo confirma sua presença.	Pesquisar no esfregaço pode consumir tempo; identificação de espécies pode ser difícil; só permite identificar gêneros de hemoparasitas.
PCR de sangue total	Ampla disponibilidade nos laboratórios de diagnóstico; sensível em infecções agudas por <i>Anaplasma</i> e <i>Ehrlichia</i> antes do início da antibioticoterapia; sensível para identificar infecções por <i>Babesia</i> e <i>Hepatozoon</i> ; dependendo do tipo de PCR, pode ser muito mais específico que um método sorológico. Alguns tipos de PCR oferecem informação quantitativa.	O resultado tarda mais do que 24 horas; alguns organismos não estão no sangue, mesmo produzindo doença clínica; pouco confiável em estado crônicos e depois do início da antibioticoterapia; não é possível a identificação do microrganismo se é um agente novo; podem acontecer falsos positivos entre microrganismos muito próximos.
Técnicas sorológicas	Disponível na clínica para detectar vários agentes; dependendo do tipo, permite detectar anticorpos para diferentes agentes em um mesmo ensaio; alguns oferecem resultados quantitativos; pode identificar infecções recentes (2-4 semanas)	Pouco útil antes da seroconversão; presença de anticorpos por meses ou anos pode complicar a interpretação dos resultados; é comum a ocorrência de reação cruzada entre microrganismos.

Fonte: (STARKEY; LITTLE, 2015).

2.1.8. Tratamento

A doxiciclina é o antibiótico de escolha para tratar a Anaplamose granulocítica canina. A dose indicada é de 5 mg/Kg /C 12 h /14- 28 dias (CARRADE et al., 2009; YANCEY et al., 2017). Outros antibióticos que tem reportado efetividade são as fluoroquinolonas e a rifampicina (MAURIN; BAKKEN; DUMLER, 2003; BRANGER; ROLAIN; RAOULT, 2004).

2.1.9. Importância na Saúde pública

Os cães são espécies domésticas que acompanham ao homem há milênios e que por serem animais de estimação, muitas vezes tem mais um valor sentimental do que econômico. Devido a esta proximidade, as doenças transmitidas por carrapatos tornam-se de especial interesse, pois são um risco para saúde do animal como para o proprietário. Segundo a Organização Mundial da ou de Saúde, as zoonoses são “doenças ou

infecções naturalmente transmissíveis entre animais vertebrados e seres humanos” (OMS, 2016).

Dentro deste grupo de doenças, *A. phagocytophilum* é o agente causal da CGA e HGA. É considerada uma doença zoonótica emergente de distribuição mundial (DUMLER et al., 2001; CARRADE et al., 2009) por qual tem sido motivo de diferentes pesquisas. Em um estudo retrospectivo nos Estados Unidos entre os anos 2000-2007 foi observado um aumento nos casos de HGA de 1,4 até 3 casos/milhão de pessoas/ano, 36% deles foram hospitalizados e 0,6% dos casos foram fatais (DAHLGREN et al., 2011).

No Brasil ainda não existem casos reportados da HGA, não obstante, o agente já tem sido identificado usando RT-PCR em municípios do estado de Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2011) e em Belo Horizonte, utilizando a nPCR (SILVEIRA et al., 2015, 2017). Estes resultados são especialmente interessantes porque evidenciam a circulação deste agente zoonótico em áreas urbanas das cidades indicando risco iminente na saúde humana. Também foi detectada no estado de Paraná, mas nesta oportunidade usando uma ELISA comercial (VIEIRA et al., 2012). Como mencionado anteriormente, existe a possibilidade de acontecer reação cruzada com *A. platys* (CHANDRASHEKAR et al., 2010). Novas pesquisas deveriam ser realizadas para compreender melhor o mecanismo de reação cruzada entre estes microrganismos.

Estudos em outras espécies também revelaram a presença do agente. Nos Estados Unidos *A. phagocytophilum* foi detectado em gatos domésticos (MAGNARELLI et al., 2005). A presença de anticorpos contra *A. phagocytophilum* em cavalos da Polícia Montada criados em áreas urbanas foi identificada no estado do Rio de Janeiro (ROLIM et al., 2015). Em outro estudo com 19 animais de Goiânia/GO e um de Brasília/DF 65% (13/20) dos soros avaliados foram positivos para *A. phagocytophilum*, mas nenhum deles foi positivo na nPCR (SALVAGNI et al., 2010). Em Minas Gerais, 2% (8/396) das amostras foram positivas na PCR. Os resultados obtidos na pesquisa alertam sobre a importância de mais trabalhos acerca da epidemiologia da doença no Brasil (PRADO, 2014).

2.2. Outros hemoparasitas

No Brasil, *Hepatozoon*, *Ehrlichia* e *Babesia* são os gêneros de hemoparasitas diagnosticados com maior frequência em cães (SILVA et al., 2014), neste estudo também foi possível detectar a presença de *A. platys*. O protozoário *Rangelia vitalii* também tem sido identificado no país (SOARES et al., 2011).

2.2.1. Ehrlichia canis

Descrita pela vez primeira na Argélia (DONATIEN; LESTOQUARD, 1937). A infecção é conhecida como erliquiose monocítica canina ou trombocitopenia canina tropical (HARRUS; WANER, 2011). *Ehrlichia canis* (*E. canis*) é uma bactéria intracitoplasmática, pleomórfica, usualmente de forma elipsoidal e que geralmente infecta monócitos e precursores medulares (DUMLER et al., 2001; MOREIRA; PASSOS, 2005).

O vetor é o carrapato marrom do cachorro *R. sanguineus* sensu latu, onde tem transmissão transtadiária (GROVES et al., 1975). Existem estudos que evidenciam que este tipo de carrapatos podem parasitar humanos. Na cidade de Recife, foram coletados *R. sanguineus* que estavam parasitando a quatro proprietários de cachorros. Esta espécie de carrapato é o vector de *E. canis* e de *Rickettsia conorii*, o agente etiológico da febre botonosa em humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006). Alguns casos reportados detectaram *E. canis* produzindo doença clínica em humanos o que sugeriria o potencial zoonótico que a bactéria tem (PEREZ et al., 2006).

Sinais clínicos comumente descritos em cães são febre, depressão, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia e hemorragias. A principal alteração hematológica é a trombocitopenia, assim também, pode se observar anemia (normalmente normocítica-normocrômica) e leucopenia, ocasionalmente pode haver linfocitose (MACIEIRA et al., 2005; UENO et al., 2009; HARRUS; WANER, 2011). A redução na contagem destas células pode ser por destruição imunomediada e em estados crônicos relata-se que bicitopenia ou pancitopenia é por conta de hipoplasia medular. Hipoalbuminemia e aumentos nos níveis séricos de ALT podem ser

evindenciados na bioquímica sanguínea dos animais infectados (MYLONAKIS et al., 2004; THRALL, 2007). O tratamento é similar ao descrito para *A. phagocytophilum*.

2.2.2. *Anaplasma platys*

Inclusões intraplaquetárias foram identificadas e isoladas em um cachorro nos Estados Unidos em 1978. Utilizando microscopia eletrônica, sugeriu-se que estes microrganismos pertenciam ao ordem das Rickettsias (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978), posteriormente esta bactéria seria identificada como *A. platys*. A doença é conhecida como trombocitopenia infecciosa cíclica canina. No esfregaço sanguíneo, é visualizada como inclusões basofílicas no citoplasma das plaquetas, além disso, relata-se a infecção de megacariócitos e promegacariócitos (DE TOMMASI et al., 2014). Acredita-se que o vector é *R. sanguineus* (RAMOS et al., 2014).

Com frequência os sinais clínicos de cães infectados são leves: letargia, secreção ocular, síndrome respiratória, esplenomegalia, epistaxe, entre outros. Normalmente não é uma doença mortal (RYMASZEWSKA; GREEDA, 2008; DE TOMMASI et al., 2014). As alterações laboratoriais descritas são trombocitopenia, anemia, leucopenia, hipoalbuminemia, aumento do nitrogênio ureico no sangue (NUS) e do fósforo mas a severidade destas podem estar associadas a co-infecções ou outras situações clínicas (KONTOS; PAPADOPOULOS; FRENCH, 1991; SAINZ; AMUSATEGUI; TESOURO, 1999; DYACHENKO et al., 2012). A partir do resultado de pesquisas nos quais foi possível à amplificação de DNA de *A. platys* em humanos (MAGGI et al., 2013; ARRAGA-ALVARADO et al., 2014), mais estudos deveriam ser realizados com o objetivo de determinar o potencial zoonótico deste microrganismo. O tratamento é similar ao descrito para *E. canis*.

2.2.3. *Babesia canis*

A babesiose canina é uma doença de distribuição mundial, produzida por *Babesia canis* (*B. canis*), um protozoário pertencente ao filo *Apicomplexa*, ordem *Piroplasmida* que infecta várias espécies de

vertebrados. A partir de estudos moleculares e genéticos, *B. canis* foi separada em três subespécies diferentes: *Babesia canis canis*, *Babesia canis Rossi* e *Babesia canis vogeli* (*B. vogeli*), onde a última mencionada está presente no Brasil. O vetor deste protozoário é *R. sanguineus*, sua transmissão é em forma transestadial e transovariana (HAUVIN et al., 2009).

O estado clínico nos animais afetados por *Babesia* foi avaliado em um grupo de cães naturalmente infectados por *B. canis* foram observados anorexia, letargia, desidratação, febre como sinais clínicos mais comuns. No hemograma: anemia hemolítica entre discreta a intensa de tipo normocítica-normocrômica, leucopenia com neutropenia e trombocitopenia marcada. Os analitos da bioquímica sérica mostraram hipoalbuminemia, hiperfibrinogenemia, aumento das enzimas ALT, AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), CK (creatina quinase), hiperbilirrubinemia e diminuição do ferro. No urinálise, a hemoglobinúria foi evidenciada (FURLANELLO et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2008).

O tratamento terapêutico de escolha é o dipropionato de imidocarb, utilizado a uma dose de 5.0-6.6 mg/Kg/SC ou IM, e repetindo a aplicação 15-20 dias depois (VIAL; GORENFLOT, 2006). O diaceturato de diminazene mostra-se efetivo para o tratamento da babesiose canina e a tripanossomíase. É utilizado com uma única dose de 3.5 mg/Kg/IM mas quando é excedida os animais são intoxicados e frequentemente morrem (FLORES et al., 2014).

2.2.4. Hepatozoon canis

Hepatozoon canis (*H. canis*) é um protozoário descrito pela primeira vez em 1905 (JAMES, 1905). Existem duas espécies reconhecidas: *H. canis* (presente no Brasil e outros países do mundo) e o *H. americanum* (Estados Unidos) (POTTER; MACINTIRE, 2010; SPOLIDORIO et al., 2011). As duas espécies são morfológica e geneticamente muito parecidas, mas as síndromes que produzem variam notavelmente. Infecções por *H. canis* são desde subclínicas até uma doença leve, por conta disso alguns pesquisadores acreditam que é pouco patogênico. No caso de *H.*

americanum, o quadro clínico geralmente é mais grave e os animais afetados sem tratamento tem alto risco de óbito (BANETH et al., 2003).

A infecção do hospedeiro vertebrado acontece pela ingestão do carrapato infectado com o oocisto de *Hepatozoon*. Os gamontes infectam neutrófilos ou monócitos e são visualizados como inclusões ovais intracitoplasmáticas (BANETH et al., 2003). É transmitido transestadialmente, mas também pode ser transmitido verticalmente desde a mãe para os filhotes (MURATA et al., 1993)

Normalmente as infecções são subclínicas a até é considerado como patógeno oportunista. Quando existem sinais clínicos, relata-se anorexia, perda de peso e membranas mucosas pálidas (PALUDO et al., 2003). Laboratorialmente observa-se anemia (normocítica-normocrômica), leucocitose por neutrofilia, linfopenia, monocitose, eosinofilia e basofilia hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumentos séricos da GGT e CK (AGUIAR et al., 2004; O'DWYER et al., 2006). O tratamento é similar ao descrito na babesiose canina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Detectar através de nPCR a presença de *A. phagocytophilum* e outros hemoparasitos em cães infectados e/ou trombocitopênicos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa – MG.

3.2. Objetivos específicos

- Coletar sangue de cães com trombocitopenia marcada (plaquetas < 100.000/ μ L) e/ou com visualização de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo.
- Detectar a presença de DNA do hemoparasitas por meio da nPCR de sangue.

- Enviar para sequenciamento de DNA aquelas amostras positivas para hemoparasitas na nPCR.
- Avaliar e correlacionar os resultados obtidos através dos métodos moleculares com as alterações hematológicas presentes nos hemogramas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comissão de ética

O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA/UFV e foi devidamente autorizado pelo processo número 84/2016.

4.2. Local de processamento das amostras

O processamento e preservação inicial das amostras foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do DVT e no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), pertencente ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), ambos da UFV.

A extração do DNA e a nPCR realizaram-se no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O DNA extraído foi enviado para sequenciamento ao laboratório Myleus[®], na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

4.3. Amostras

Foram coletadas e preservadas amostras de sangue total com EDTA de 100 cães com trombocitopenia marcada (plaquetas $<100.000/\mu\text{L}$), ou com visualização direta de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo. O material foi obtido da rotina do Laboratório de Análises Clínicas do DVT da UFV. O estudo foi realizado com animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário da UFV.

4.4. Processamento das amostras

As amostras de sangue foram processadas da seguinte forma:

- Realização do hemograma com contador automatizado de células (URIT 3000[®]). A contagem diferencial dos leucócitos e pesquisa de hematozoários foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos com coloração tipo Romanowsky, com posterior leitura realizada no microscópio óptico. A determinação de proteínas plasmáticas foi realizada por refratometria.
- Depois de identificar animais com trombocitopenia verdadeira ou visualização de hematozoários no esfregaço sanguíneo, 300 µL de sangue foram separados, rotulados e congelados em tubos Eppendorf[®] até a extração de DNA.

4.5. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada empregando o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (PROMEGA) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi identificado e congelado até realizar a nPCR.

4.6. Reação em cadeia da polimerase

O DNA foi amplificado através da nPCR para *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia spp* e parasitas do ordem *Piroplasmida*. No caso de *R. vitalii* foi usada PCR convencional. Os reagentes utilizados para cada reação estão indicados na tabela 4. Os primers utilizados em cada caso estão especificados na tabela 5. A programação do termociclador está indicada na tabela 6.

Tabela 4. Condição da nPCR utilizada nas diferentes reações.

Reagente	Volume (µl)
H ₂ O MiliQ	3,6
Taq polimerase	5,0
Mix primer (F+R) (10nM)	0,4
DNA / Produto da 1ra reação	1,0
Volume final	10,0

Tabela 5. Sequência de primers utilizados para identificação de *A. phagocitophilum* e outros hemoparasitas.

Hemoparasita	Primers (5´-3´)	Nome	Alvo	Tamanho (pb)	Referência
<i>Anaplasma phagocitophilum</i> 1ra reação	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTA TG	MSP4AP5; MSP4AP3	msp4	849	(DE LA FUENTE et al., 2005)
	CTATTGGYGGNGCYAGAGT; GTTCATCGAAAATTCCGTGGTA	msp4f; msp4r	msp4	381	(BOWN et al., 2007)
<i>Ehrlichia spp granulocítica</i> 1ra reação	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC; TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE3a; GE10r	16S rRNA	932	(MASSUNG et al., 1998)
	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT; GGCAGTATTAAGAAGCAGCTCCAGG	GE9f; GE2	16S rRNA	546	(MASSUNG et al., 1998)
<i>Ehrlichia spp monocítica</i> 1ra reação	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT ACAACCTTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1 FNS16SCH 1R	16s rRNA	1195	(KAWAHARA et al., 2009)
	GGGCACGTAGGTGGACTAG CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2 F NS16SCH2 R	16s rRNA	443	(KAWAHARA et al., 2009)
Piroplasmida 1ra reação	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-19; RIB-20	18s rRNA	1700	(ZAHLER et al., 2000)
	ACCTCACCAGGTCCAGACAG GTACAAAGGGCAGGGACGTA	BAB-rumF; BAB-rumR	18s rRNA	430	(SILVEIRA; RABELO; RIBEIRO, 2011)
<i>Babesia spp e Rangelia vitalii</i>	CATGAAGCACTGGCCHTTCAA GCNCKGCTGATGGTGGTGTGTA	hsp70 F1; hsp70 R1	hsp70	740	(SOARES et al., 2011)

Tabela 6. Programação do termociclador automático para realização da nPCR.

Ciclo	Passo	Temperatura (C°)	Tempo (minutos)
(1x)	Desnaturação inicial	94	5
(29x)	Desnaturação	92	1
	Anelamento	54	1
	Extensão	72	2
(1x)	Extensão final	72	8
	“Hold”	12	

Com os produtos obtidos na segunda reação foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE (0,5X). Para isto, foram aplicados 5 µL do produto amplificado, misturados com 2µL de GelRed™ (Biotium) como corante do ácido nucléico. Como padrão de peso molecular, foi utilizado 1Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 milivolts e 400 amperes por 27 minutos. Posteriormente foi observado no transluminador.

4.7. Purificação dos produtos

Uma vez realizadas as PCR, as amostras positivas foram amplificadas em duplicata para ter um volume final total de 25 µl em cada tubo como detalhado na tabela 7.

Tabela 7. Condição para o processo de purificação das amostras.

Reagente	Volume (µl)
H ₂ O MiliQ	9,0
Taq Polimerase	12,5
Mix primer (F+R) (10nM)	1,0
DNA/ Produto da 1ra reação	2,5
Total por tubo	25,0

Logo depois, as amostras foram purificadas usando um protocolo para produtos de PCR com polietilenoglicol (PEG) 20% para eliminar bandas com tamanhos menores que 300-400 pb (<http://labs.icb.ufmg.br/lbem/protocolos/peg.html>).

4.8. Encaminhamento das amostras para sequenciamento

As amostras foram reidratadas em volume proporcional de H₂O MiliQ a concentração inicial do produto da PCR. Cada amplicon foi seqüenciado duas vezes: uma vez com o primer “forward” e outra como o “reverse”. O DNA foi quantificado no NanoDrop™. Para cada amostra a ser sequenciada, preparou-se uma mistura de DNA, primer e H₂O seguindo as instruções do laboratório Myleus® (<http://facility.myleus.com/>) como descrito na tabela 8.

Tabela 8. Condição para o envio de amostras para sequenciamento.

Quantidade de DNA e primer recomendados para cada reação:	
Produto de PCR	20-30 ng de DNA a cada 100 pb da amostra
Primer	10 pmol (1µl) de uma solução a 10 µM
H ₂ O	O suficiente para um volume final total de 7,5 µl

A qualidade das seqüências resultantes foram analisadas usando o programa “Electropherogram quality analysis”, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resource and Biotechnology (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Posteriormente, para a identificação específica de cada hemoparasita, as seqüências nucleotídicas foram alinhadas na procura de bases homologas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante o aplicativo Blast® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.9. Análises estatísticas

Os dados foram analisados pela análise de variância, considerando número desigual de repetições por meio do programa estatístico SAS 9.4 (SAS Institute. 2013), usando o procedimento Proc GLM. Diferenças entre

múltiplas médias foram testadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para erro tipo I.

5. RESULTADOS

De um total de 100 amostras examinadas através da nPCR, 60% foram positivas para no mínimo um hemoparasita, como indicado na tabela 9.

Tabela 9. Número de amostras positivas para cada primer empregado na nPCR dos cães avaliados.

Primers	No. de cães
hsp70	5
Bab-Rum	12
<i>Ehrlichia spp</i> monocítica	12
<i>Ehrlichia spp</i> granulocítica	10
hsp70 + BabRum	2
hsp70 + <i>E. monocítica</i>	2
BabRum+ <i>E. monocítica</i>	3
BabRum+ <i>E. granulocítica</i>	5
<i>E. monocítica</i> + <i>E. granulocítica</i>	5
hsp70+Bab-Rum+ <i>E. monocítica</i>	1
BabRum+ <i>E. monocítica</i> + <i>E. granulocítica</i>	3
Negativo	40
TOTAL	100

Utilizando a nPCR nas amostras processadas, foi possível detectar a presença de quatro gêneros de hemoparasitas nas amostras de sangue avaliadas: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia* e *Hepatozoon*. Foram amplificadas um total de 26 produtos do primer *Ehrlichia spp* monocítica, 23 de *Ehrlichia spp granulocítica* 26 com BAB-rum, e 10 utilizando o hsp70.

Logo ao analisar os resultados, um total de 78 amostras foram enviadas para sequenciamento ao laboratório Myleus®, na cidade de Belo Horizonte, MG. Os resultados obtidos no sequenciamento foram os seguintes: 23 *E. canis* (identidade 94%-100%), 7 *A. platys* (identidade 97%-100%), 11 *B. vogeli* (identidade 86%-99%) e 15 *H. canis* (identidade 94%-99%) (tabela 10). Neste grupo de animais, em 25% (13/51) foi detectada a presença de DNA de dois hemoparasitas na mesma amostra. Nenhuma amostra foi positiva utilizando o primer msp4, específico de *A. phagocytophilum* (figura 2).

Tabela 10. Hemoparasitas identificados nas amostras processadas e número de cães positivos.

Hemoparasitas	No de cães
<i>A. platys</i>	4
<i>A. platys</i> + <i>Babesia</i> sp	2
<i>A. platys</i> + <i>E. canis</i>	1
<i>A. phagocytophilum</i> (?)	1
<i>B. vogeli</i>	8
<i>B. vogeli</i> + <i>E. canis</i>	2
<i>B. vogeli</i> + <i>H. canis</i>	1
<i>Babesia</i> sp	2
<i>Babesia</i> sp + <i>E. canis</i>	1
<i>E. canis</i>	15
<i>E. canis</i> + <i>H. canis</i>	4
<i>H. canis</i>	10
TOTAL	51

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1%. A: Marcador de peso molecular (1 kb); B: controle positivo; C-M: grupo de amostras examinadas (negativas); N: controle negativo da primeira reação; O: controle negativo da segunda reação.



O sequenciamento de uma das amostras amplificadas com o primer para *Ehrlichia spp granulocitica* teve uma identidade de 99% com a sequência parcial do gene 16S rRNA de *A. phagocytophilum* depositada no GenBank (KC455363.1). O fragmento amplificado tem tamanho de 542 pb (figura 3).

Figura 3 Alinhamento da sequencia obtida com o alvo 16S rRNA de *A. phagocytophilum* através do aplicativo Blast® (identidade 99%).

Anaplasma phagocytophilum strain GDR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KC455363.1](#) Length: 545 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 543 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
996 bits(539)	0.0	541/542(99%)	0/542(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCA	60		
Sbjct 2	ACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATGATAACAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCA	61		
Query 61	TAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATC	120		
Sbjct 62	TAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATC	121		
Query 121	CCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAG	180		
Sbjct 122	CCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAG	181		
Query 181	GGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG	240		
Sbjct 182	GGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG	241		
Query 241	GAAGTGAAGTACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG	300		
Sbjct 242	GAAGTGAAGTACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG	301		
Query 301	CGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTT	360		
Sbjct 302	CGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTT	361		
Query 361	TCAGTGGGGAAGATAAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCAGGAACTCCCGTCCAGCA	420		
Sbjct 362	TCAGTGGGGAAGATAAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCAGGAACTCCCGTCCAGCA	421		
Query 421	GCCGCGGTAATAACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTA	480		
Sbjct 422	GCCGCGGTAATAACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTA	481		
Query 481	GGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGAGCTGCTTTTAAATAC	540		
Sbjct 482	GGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGAGCTGCTTTTAAATAC	541		
Query 541	TG 542			
Sbjct 542	TG 543			

Quando esta mesma sequência é comparada com outras espécies diferentes do gênero *Anaplasma* que infectam cães, como *A. platys* (Figura 4) e sequências similares a *A. phagocytophilum* depositadas na base de dados do NCBI e comparadas com o Multiple Sequence Alignment - MUSCLE- (<https://www.ebi.ac.uk>) a similitude é muito evidente (Anexo 1).

Figura 4. Alinhamento da sequência obtida com o alvo 16S rRNA de *A. platys* através do aplicativo Blast® (identidade 99%).

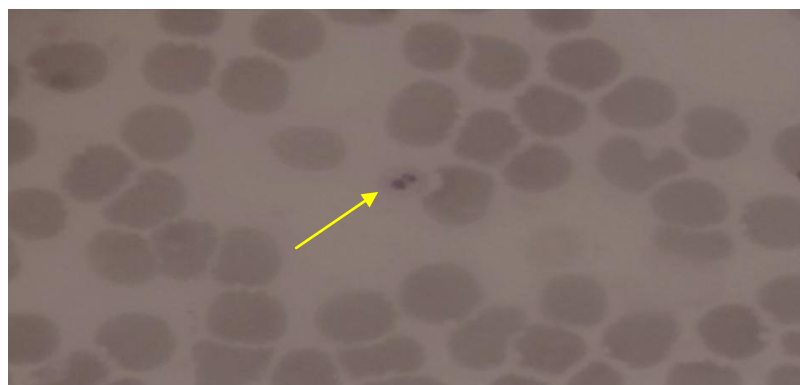
Anaplasma platys isolate D35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KX792089.2](#) Length: 1431 Number of Matches: 1

Range 1: 64 to 590 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
974 bits(527)	0.0	527/527(100%)	0/527(0%)	Plus/Plus
Query 16	TAGCTTGCTATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAG	75		
Sbjct 64	TAGCTTGCTATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAG	123		
Query 76	TAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGA	135		
Sbjct 124	TAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGA	183		
Query 136	TTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCA	195		
Sbjct 184	TTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCA	243		
Query 196	AGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGTACGGT	255		
Sbjct 244	AGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGTACGGT	303		
Query 256	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAATGGGCGCAAGCCTGATCCA	315		
Sbjct 304	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAATGGGCGCAAGCCTGATCCA	363		
Query 316	GCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTTTTCAGTGGGGAAGATA	375		
Sbjct 364	GCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTTTTCAGTGGGGAAGATA	423		
Query 376	ATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGG	435		
Sbjct 424	ATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGG	483		
Query 436	AGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGGTAAAGT	495		
Sbjct 484	AGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGGTAAAGT	543		
Query 496	TAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGAGCTGCTTTTAATACTG	542		
Sbjct 544	TAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGAGCTGCTTTTAATACTG	590		

Em duas amostras examinadas no esfregaço foram identificadas estruturas intraplaquetarias compatíveis com *A. platys*, mas no momento de realizar a nPCR, nenhum produto foi amplificado (figura 5).

Figura 5. Inclusão intraplaquetaria sugestiva de *A. platys* (seta). Na nPCR o resultado foi negativo, 1.000x.



Os índices hematológicos dos animais positivos exclusivamente para um tipo de primer estão na tabela 11.

Tabela 11. Valores médios dos índices hematológicos de animais positivos exclusivamente para um tipo de primer e dos animais negativos.

VARIÁVEL	PRIMERS						VALOR P
	Hsp70	BAB-rum	NS16SC	EG	Negativo	EP	
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	3.522 ac	4.950 a	2.965 c	4.644 ab	3.558 bc	0.719	0.0226*
Hemoglobina (g/dL)	8.060 ab	10.400 a	6.475 b	10.300 a	7.817 b	1.562	0.0352*
Hematócrito (%)	24.360	31.830	19.725	30.530	24.382	4.755	0.0534
VCM (fL)	71.960	64.450	68.558	66.760	69.487	3.150	0.2182
HCM (pg)	23.540	21.520	22.425	22.424	21.983	0.924	0.4353
CHCM (%)	32.820	32.720	32.861	33.683	31.744	1.000	0.1199
Leucócitos (x 10 ³ /μL)	12540.000	12830.000	14275.000	8700.000	9885.000	3596.491	0.3781
Segmentados (x 10 ³ /μL)	6490.200	8280.400	10477.500	5063.600	6911.425	2921.534	0.3581
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	2721.000	2619.500	1522.500	1776.600	1527.575	804.877	0.3430
Monócitos (x 10 ³ /μL)	1459.400	963.600	1276.500	1370.300	698.850	417.270	0.1082
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	318.200	872.700	334.250	146.700	280.825	302.160	0.1321
Bastonetes (x 10 ³ /μL)	298.200	93.800	664.250	342.800	440.425	385.702	0.6320
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	70400 ab	119200 a	50500 b	74520 ab	51325 b	26412	0.0279*
Proteína plasmática (g/dL)	6.090 b	7.840 a	6.433 b	6.490 b	7.015 ab	0.536	0.0255*

(hsp70, BAB-rum, NS16SC, EG: primers empregados; EP: erro padrão) Valores seguidos por letra minúscula diferente na mesma linha para a mesma variável são diferentes entre os índices hematológicos avaliados. * (P <0,05). Valores de referência no anexo 2.

6. DISCUSSÃO

6.1 Detecção molecular

6.1.1 *A. phagocytophilum*

Apesar de que foi obtida uma sequência com identidade de 99%, a não amplificação de produtos com um primer específico para *A. phagocytophilum* com as amostras analisadas, não exclui a possibilidade que a bactéria esteja presente no município de Viçosa e a microrregião.

Neste estudo, somente foram consideradas amostras de animais com trombocitopenia importante ou com visualização direta de hemoparasitas no esfregaço e muitas vezes tinham alguma condição de doença. Entretanto nos cachorros descritos por Silveira *et al.*, (2017) não tinham evidência clínica de doença, o que sugeriria que em alguns casos os cães podem ser portadores assintomáticos de *A. phagocytophilum*.

No trópico as co-infecções por diferentes agentes infecciosos são comumente detectadas. Justamente uma causa para a obtenção desta sequência pode ser pela presença dos dois patógenos do mesmo gênero mas de espécies diferentes, neste caso *A. platys* e *A. phagocytophilum*. Os primers empregados tem por sequência alvo o gene 16s rRNA, que é muito conservado na família Anaplasmatacea e que nessa situação pode dificultar a adequada identificação da amostra.

Embora a grande sensibilidade na PCR, a técnica não é isenta a erros, sejam próprios ou de etapas anteriores. Contaminação, pouca quantidade de DNA extraído do sangue ou que este material seja de baixa qualidade com certeza pode influir no resultado final da PCR.

Em quanto ao próprio processo molecular, são identificadas duas condições importantes durante a amplificação de produtos na PCR: (1) que todas as moléculas replicadas sejam idênticas e (2) que o número de moléculas a duplicar não produza alterações nas reações de duplicação. Na primeira condição, além da sequência alvo, algumas moléculas artificiais denominadas “quimeras” e “heteroduplex” são produzidas em até um 12% induzindo alterações no emparelhamento e por consequência na amplificação de produtos. A segunda condição está relacionada com a eficiência da PCR. Aqui, é esperado que o 100% das sequência obtidas no

primeiro ciclo aumentem em forma exponencial, mas quando existe um excesso de DNA, só uma fração deste material genético participa da replicação e a eficiência do processo diminui com cada ciclo realizado (SHARIFIAN, 2010).

O resultado das técnicas moleculares pode também ser influenciado por variações antigênicas nas sequências alvo. Estas variações já foram descritas para proteínas de superfície em hemoparasitas do gênero *Anaplasma*. Existem regiões específicas do genoma que são capazes de produzir estas variações através da recombinação de pseudogenes que impediriam o normal anelamento em uma PCR. Em *Anaplasma marginale*, pequenas alterações da sequência na região hipervariável do gene *msp2* juntamente com a identificação de nove pseudogenes a partir de uma única estirpe de *Anaplasma marginale* permitiria expressar muitas variantes desta proteína, evadindo a resposta imune do hospedeiro e permitiria estados de animais persistentemente infectados (BRAYTON et al., 2002; DE LA FUENTE et al., 2005). Ainda mais importante, para determinar se estas possíveis mutações são consistentes com espécies de *Anaplasma* em clados filogenéticos diferentes aos já definidos, estabelecer futuros estudos genéticos, assim como conseguir o isolamento de cepas brasileiras de *A. phagocytophilum* devem ser objetivos de futuras pesquisas na saúde pública veterinária. Na Colômbia, Vargas-Hernandez et al., (2016) em um estudo realizado com o objetivo de detectar molecularmente a presença de espécies de *Anaplasma*, identificaram duas amostras como *A. platys* e uma como *Anaplasma sp.* (similar à *A. phagocytophilum*). Porém, quando estas amostras foram submetidas a RT-PCR utilizando o gene específico *msp-2-A. phagocytophilum* as não foi possível amplificar nenhum produto. Assim, os autores sugerem que pode se tratar de uma espécie filogeneticamente similar a *A. phagocytophilum* que está presente na Colômbia. Em consideração ao objetivo geral desta pesquisa, além de usar primers para o gene *msp4*, no futuro poderiam ser empregados outros com diferentes sequências alvo, tais como os genes *msp2/p44*, *groESL* e o *ankA* (RYMASZEWSKA; GREYDA, 2008).

Enquanto a prevalência no Brasil, utilizando RT-PCR em três municípios do estado de Rio de Janeiro, 7,11% (18/253) das amostras foram

positivas na RT-PCR, amplificando o gene *msp2* (SANTOS et al., 2011). Na cidade de Belo Horizonte foi constatado em pesquisa uma mórula infectando um neutrófilo no esfregaço de sangue de um animal que estava com suspeita clínica de hemoparasitose. Obteve-se um resultado positivo na nPCR utilizando como alvo o gene *msp2/p44* e *msp4* (Silveira 2015). Dois anos depois, a mesma autora realizou um estudo para conhecer a prevalência deste microrganismo na cidade onde obteve 11% (7/62) e 8% (6/72) usando como alvos os genes *msp4* e *msp2/p44* respectivamente.

No estado de Paraná, a prevalência de *A. phagocytophilum* em 13.8% dos cães avaliados através de teste sorológico (VIEIRA et al., 2012). Como mencionado anteriormente, existe a possibilidade de acontecer reação cruzada com *A. platys* (CHANDRASHEKAR et al., 2010).

Em outro estudo sorológico em cães em estados do nordeste, centro-oeste, sudeste e oeste dos Estados Unidos foi obtida uma média 4,8% (232.34/479.640) (BOWMAN et al., 2009). Na cidade de Baxter, estado de Minnesota (considerada área endêmica para *A. phagocytophilum* e outras doenças) em uma população de 731 cães, anticorpos foram detectados em 217 (29%) e o DNA foi amplificado em 3% (7/222) (BEALL et al., 2008).

Em países europeus, quando foram utilizados métodos de diagnóstico indiretos foi observada uma prevalência entre 7,5% e 56%. Em alguns casos que foi utilizada a PCR, observou-se prevalência entre 0% e 6,3%. Na Alemanha, por exemplo, 522 cães (258 com suspeita de hemoparasitose e 264 clinicamente saudáveis) 43% (224/522) eram soropositivos e 30 animais foram positivos na PCR (KOHN et al., 2011). No mesmo país, em 111 animais (49 suspeitos de doença transmitida por carrapatos e 62 saudáveis), usando a técnica de IFA o 43,2% foram positivos e quando foi utilizada a nPCR, a prevalência foi de 6,3%. Os dados obtidos sugerem que o risco de infecção por *A. phagocytophilum* na Alemanha é considerável (JENSEN et al., 2007).

6.1.2 *E. canis*

Das 100 amostras de sangue avaliadas, em 26 foi possível detectar a presença de DNA do gênero *Ehrlichia*. Este resultado foi similar ao descrito

por Guedes et al., (2015) que obteve o mesmo porcentagem de amostras positivas na cidade de Ituberá-BA utilizando PCR. Outras pesquisas na mesma utilizando a mesma técnica obtiveram resultados positivos de 15% - 78% das amostras examinadas (DINIZ et al., 2007; RAMOS et al., 2009; UENO et al., 2009; SOARES et al., 2017). Na cidade de Viçosa, a prevalência deste *E. canis* variou entre 32% (OLIVEIRA et al., 2009) e 61% (OLIVEIRA, 2015). O resultado menor obtido nesta pesquisa, realizada no mesmo local pode ser atribuído ao modelo aleatório do amostragem, no entanto, o ADN deste hemoparasita é detectado com frequência em cães trombocitopênicos na cidade de Viçosa-MG.

6.1.3 *A. platys*

No caso de *A. platys*, o ADN foi amplificado em 23 amostras. Este valor foi superior ao reportado por Fernandes (2017) e Soares et al., (2017) que detectaram este microrganismo com prevalência de 10% e 17% respectivamente. No entanto, Ribeiro et al., (2017) identificaram ADN de *A. platys* no 32% das amostras. Segundo este mesmo autor, o ambiente é um fator a considerar nas infecções de *A. platys*. Neste estudo a prevalência de *A. platys* foi similar à de *E. canis*. Devido a que estas bactérias compartilhem o mesmo vetor, nesta classe de estudos é possível detectar a presença dos dois patógenos no mesmo indivíduo (SOARES et al., 2017) o que poderia explicar a prevalência semelhante observada.

Utilizando o primer para *Ehrlichia spp granulocítica* era esperado que todas as amostras positivas ao esfregaço sanguíneo para *A. platys* foram positivas na nPCR mas isto não aconteceu com duas amostras. Especificamente no caso de *A. platys*, FERREIRA et al., (2007) comparam a PCR como método diagnóstico com resultados positivos e negativos na visualização de mórulas em plaquetas no esfregaço sanguíneo de 101 cachorros. Embora não houve diferença significativa entre os métodos diagnósticos, 15% que tinham corpos de inclusão foram positivos na PCR para *A. platys*. Os autores sugerem que a presença de grânulos inespecíficos deve ser distinguida de mórulas de hemoparasitas para evitar

diagnósticos e tratamentos equivocados nestes animais. Outra explicação pode ser a erros durante a realização da PCR (SHARIFIAN, 2010).

6.1.4 Babesia e Hepatozoon

A presença de ADN destes protozoários foi identificado com similar frequência. Do gênero *Babesia* foi detectada com sucesso em 16 amostras, das quais 11 foram identificadas como *B. vogeli*. Este achado foi idêntico ao descrito por Ribeiro et al., (2017) e maior ao obtido por Araujo et al., (2015) com 6% de amostras positivas. Pelo contrário, Spolidorio et al. (2009) identificaram ADN de *Babesia* em 22% das amostras, assim como FERNANDES, (2017) quem obteve um 45% de positividade.

Nas 15 amostras nas quais foram amplificados produtos pertencente ao gênero *Hepatozoon*, em todas a espécie identificada foi *H. canis*. No município de Campo Grande-MS, Ramos et al. (2015) identificaram este hematozoário com uma frequência de 3,6% nas amostras avaliadas na PCR. Uma maior quantidade de animais infectados por *H. canis* foi descrita por Spolidorio et al. (2009) quem relatou 59% de produtos amplificados nas amostras sometida a PCR. Neste mesmo estudo, todos os animais que foram positivos para *Babesia* (22%) evidenciaram presença de *Hepatozoon*. Considerando que estes protozoários compartilhem vetor, ainda que o método de infecção difira, a co-infecção assim como prevalência destes pode ser detectado com relativa frequência em estudos epidemiológicos.

6.2 Alterações hematológicas

Em referência aos índices hematológicos (tabela 10), foi observada diferença significativa ($p < 0.05$) nas variáveis hemácias, hemoglobina, plaquetas e proteínas plasmáticas quando são comparadas amostras positivas para um primer específico e animais negativos na nPCR. As diferenças mais significativas foram observadas entre as amostras positivas para os primers de *Ehrlichia spp monocitica* e BAB-rum, que reconhece a presença de DNA de *Hepatozoon* e babesia. Os valores médios para variável hemácias em todos os casos estavam diminuídos frente aos valores de referência (THRALL, 2007).

A anemia é um achado comum na erliquiose monocítica canina, sendo que na fase aguda é leve ou moderada e em estados crônicos é muito mais marcada (HARRUS; WANER, 2011). Neste estudo, os animais apresentaram anemia intensa (hemácias: $2,9 \times 10^6/\mu\text{L}$; hemoglobina: 6,4 g/dL; hematócrito: 19,7%). Os resultados são menores aos observados por De Castro et al., (2004) que obteve valores médios $3,9 \times 10^6/\mu\text{L}$ de hemácias e 9,0 g/dL em cães experimentalmente infectados com *E. canis*. Outros autores também reportam anemia como achado laboratorial: MACIEIRA et al., (2005) em um grupo de cães trombocitopênicos observaram valores de hemácias $< 5.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ e hemoglobina < 12.0 g/dL no 26,8% que eram positivos na PCR para *E. canis*.

UENO et al., (2009) encontraram anemia com os mesmos critérios mencionados anteriormente em 40% das amostras positivas para *E. canis* na PCR. Em alguns casos, a anemia pode ser observada em 100% das amostras examinadas, mas isto geralmente está relacionado com estados crônicos (MYLONAKIS et al., 2004).

A anemia e outras alterações hematológicas relacionadas podem ter uma origem imunomediada. Tem-se sugerido que a imunopatogênese nas doenças transmitidas por carrapatos em geral iniciam desde o momento da alimentação, onde proteínas que estão presentes na saliva do vetor induzem uma resposta mediada por células Th2 que liberam IL-4, IL-5 e IL-10. Estas são citocinas anti-inflamatória que (especialmente a IL-10) tem a capacidade de inibir a secreção de interleucinas de tipo Th1, como o IFN- γ , o que evitaria a ativação de macrófagos e uma menor resposta contra patógenos intracelulares como os hemoparasitos (KIDD, 2003). Além disso, são produzidos anticorpos que podem atuar como mediadores no origem da doença clínica, produzindo entre outras alterações, formação de auto-anticorpos e de imunocomplexos que induziram danos em diferentes tecidos. Provavelmente o origem da anemia seja imunomediada através da produção de anticorpos anti-eritrocitários (HARRUS et al., 2001; SHAW et al., 2001).

Referente à as amostras positivas somente ao primer Bab-Rum, a maioria foram positivas para *H. canis*. A infecção por este hemoparasita normalmente produz doença subclínica e em alguns casos leve a moderada, possivelmente devido a estar bem adaptado ao seu hospedeiro. A forma

subclínica ou leve geralmente está associada a baixa parasitemia e elevada carga parasitária produz um quadro clínico mais forte (BANETH et al., 2003).

Neste estudo, o valor das hemácias e hemoglobina média foi de $4,9 \times 10^6/\mu\text{L}$ e 10,4 g/dL respectivamente, sendo classificada como anemia discreta. No Brasil, O'DWYER et al., (2006) diagnosticaram *H. canis* no 5,9% (13/222) dos cães estudados. Entre esses animais, três apresentaram anemia discreta (valores de hemoglobina entre 8,7 g/dL e 10,4 g/dL), similar ao resultado obtido neste trabalho e só um tinha uma discreta leucocitose (leucócitos: 18200/ μL) como únicas alterações no hemograma. AGUIAR et al., (2004) em três animais que também foram diagnosticados pelo esfregaço sanguíneo, relataram anemia regenerativa, leucocitose por neutrofilia, linfopenia e monocitose nos hemogramas.

OTRANTO et al., (2011) detectaram *H. canis* através de diferentes métodos diagnósticos. Nos animais que foi possível avaliar os hemogramas e que eram positivos para este hemoparasita foram descritas eosinofilia (20/26), leucocitose (12/26), linfocitose (8/26), neutrofilia (6/26), monocitose e trombocitopenia (5/26) e anemia (1/26).

A diferença de *H. americanum* que produz doença grave e a patogenicidade de *H. canis* é muito discutida. Quando existe infecção somente por *H. canis*, as alterações laboratoriais evidenciadas muitas vezes não podem ser atribuídas em forma exclusiva a este protozoário e sim a outros fatores, tais como idade e estados de imunossupressão por infecções e outros processos inflamatórios concomitantes (BANETH et al., 2003).

A trombocitopenia na erliquiose monocítica canina talvez seja o achado laboratorial mais frequente, sendo descrito em até o 100% dos animais positivos para *E. canis* (MYLONAKIS et al., 2004; UENO et al., 2009). Os mecanismos envolvidos na trombocitopenia seriam os mesmos descritos na destruição imunomediada de hemácias através da formação de anticorpos anti-plaquetários (HARRUS et al., 2001; SHAW et al., 2001). No caso das proteínas, foram estatisticamente significativas no grupo de amostras positivas para o primer Bab-Rum. As proteínas séricas são determinadas através da somatória das frações protéicas (albumina e globulinas). Devido a estados de exoantígenos persistentes em casos de hemoparasitoses, um estado de hiperglobulinemia sérica associadas a

gamopatias monoclonais ou policlonais induzem formação de imunocomplexos e doença polisistêmica imunomediada (SHAW et al., 2001). Se bem que, nos casos de hepatozoonose canina as alterações bioquímicas são pouco específicas, a hiperglobulinemia as vezes é o único achado bioquímico relatado (AGUIAR et al., 2004; O'DWYER et al., 2006). Os mecanismos fisiopatológicos destas alterações estão ilustrados na figura 5.

Entre os hemogramas dos animais positivos aos primers hsp70 e *Ehrlichia* spp granulocítica não houve diferença estatística significativa quando comparadas com animais negativos na nPCR. Neste último grupo de exames, a presença de anemia e trombocitopenia presumivelmente foram originadas por outras condições clínicas e fisiológicas que não eram de interesse nesta pesquisa.

7. CONCLUSÕES

- Nas amostras examinadas não foi possível detectar a presença de *A. phagocytophilum*.
- A ausência de produtos amplificados na nPCR de *A. phagocytophilum* nos sequenciamentos obtidos na população deste estudo não implica que este microrganismo esteja ausente na cidade ou na microrregião de Viçosa. Futuros estudos serão necessários para estabelecer a prevalência deste agente zoonótico na zona estudada.
- *E. canis* foi o hemoparasita detectado com maior frequência em cães trombocitopênicos utilizando a nPCR como técnica molecular.
- No grupo de amostras que foi possível sequenciar geneticamente, em 25% foi detectada a presença de DNA de dois hemoparasitas na mesma amostra (alguns de gêneros diferentes). Esta informação é de especial interesse no tratamento quimioterapêutico dos animais infectados.
- As alterações hematológicas mais significativas foram anemia, trombocitopenia e aumento das proteínas plasmáticas, especialmente em animais positivos para *E. canis*.

- A trombocitopenia pode ser considerada uma alteração sensível nos casos de hemoparasitose, porém, não é específica. A utilização de métodos moleculares diagnósticos é importante para evitar a utilização desnecessária de antibióticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGUIAR, D. M.; RIBEIRO, M. G.; SILVA, W. B.; DIAS, J. G.; MEGID, J.; PAES, A. C. Hepatozoonose canina: Achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 411–413, 2004.

ALBERDI, M. P.; WALKER, a R.; URQUHART, K. a. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. **Epidemiology and infection**, v. 124, n. 2000, p. 315–323, 2000.

ARAUJO, A. C.; SILVEIRA, J. A.; AZEVEDO, S. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; RIBEIRO, M. F.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 456-461, 2015.

ARRAGA-ALVARADO, C. M.; QUROLLO, B. A.; PARRA, O. C.; BERRUETA, M. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1161–1165, 2014.

AYLLÓN, N.; VILLAR, M.; BUSBY, A. T.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BONZÓN-KULICHENKO, E. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits apoptosis

and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2415–2425, 2013.

BANETH, G.; MATHEW, J. S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D. K.; BARTA, J. R.; EWING, S. A. Canine hepatozoonosis: Two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon spp.* **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 27–31, 2003.

BEALL, M. J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M. D.; CYR, K. E.; DINIZ, P. P. V. 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.

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, K. J.; LAMBIN, X.; OGDEN, N. H.; PETROVEC, M.; SHAW, S. E.; WOLDEHIWET, Z.; BIRTLES, R. J. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1771–1776, 2007.

BOWN, K. J.; LAMBIN, X.; TELFORD, G. R.; OGDEN, N. H.; TELFER, S.; WOLDEHIWET, Z.; BIRTLES, R. J. Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7118–7125, 2008.

BRANGER, S.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* by Real-Time PCR. v. 48, n. 12, p. 4822–4828, 2004.

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.

CARRADE, D. D.; FOLEY, J. E.; BORJESSON, D. L.; SYKES, J. E. Canine granulocytic anaplasmosis: A review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1129–1141, 2009.

CHAE, J. S.; YU, D. H.; SHRINGI, S.; KLEIN, T. A.; KIM, H. C.; CHONG, S. T.; LEE, I. Y.; FOLEY, J. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 3, p. 285–293, 2008.

CHANDRASHEKAR, R.; MAINVILLE, C. A.; BEALL, M. J.; CONNOR, T. O.; EBERTS, M. D.; ALLEMAN, A. R.; GAUNT, S. D.; BREITSCHWERDT, E. B. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 71, n. 12, p. 1443–1450, 2010.

CHEN, S.; DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S.; WALKER, D. H.; AL, C. E. T. Granulocytotropic Ehrlichia Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 595, n. 409, p. 589–595, 1994.

CHOI, K. S.; WEBB, T.; OELKE, M.; SCORPIO, D. G.; DUMLER, J. S. Differential innate immune cell activation and proinflammatory Response in *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 3124–3130, 2007.

CHOI, K. S.; GARYU, J.; PARK, J.; DUMLER, J. 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.

DAHLGREN, F. S.; MANDEL, E. J.; KREBS, J. W.; MASSUNG, R. F.; MCQUISTON, J. H. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000–2007. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 1, p. 124–131, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64–67, 2006.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; KOCAN, K. M. *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 173–180, 2016.

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A. J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; GORTA, C.; 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. 75–90, 2005.

DINIZ, P. P. V., SCHWARTZ, D. S., DE MORAIS, H. S. A.; BREITSCHWERDT, E. B. (2007). Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 689-698, 2007.

DE TOMMASI, A. S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E. B.; STANNECK,

D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; DE CAPRARIIS, D. Anaplasma platys in bone marrow megakaryocytes of young dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2231–2234, 2014.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. **Arch Inst Pasteur Alger**, v. 15, p. 142–187, 1937.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BAKKER, C. P.; DASCH, G. a.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGWIRA, F. R. Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia with neorickettsia, description of six new species combinations and designatio. **International Journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 2001, p. 2145–2165, 2001.

DUMLER, J. S.; CHOI, K. S.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BARAT, N. S.; SCORPIO, D. G.; GARYU, J. W.; GRAB, D. J.; BAKKEN, J. S. Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1828–1834, 2005.

DYACHENKO, V.; PANTCHEV, N.; BALZER, H. J.; MEYERSEN, A.; STRAUBINGER, R. K. First case of Anaplasma platys infection in a dog from Croatia. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2012.

EBANI, V. V.; BERTELLONI, F.; TORRACCA, B.; CERRI, D. Serological survey of Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma phagocytophilum, and Ehrlichia canis infections in rural and urban dogs in Central Italy. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 21, n. 4, 2014.

EGENVALL, A.; BJÖERSDORFF, A.; LILLIEHÖÖK, L.; OLSSON ENGVALL, E.; KARLSTAM, E.; ARTURSSON, K.; HEDHAMMAR, Å.; 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. E.; HEDHAMMAR, A. A.; BJÖERSDORFF, A. I. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 9, p. 222–226, 1997.

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

FERNANDES, M. Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia spp.*, *Anaplasma platys* e *Hepatozoon spp.* em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB. 2017. TCC. Universidade Federal da Paraíba.

FLORES, M. M.; PEREIRA, P. R.; MAZZANTI, A.; KOMMERS, G. D.; FIGHERA, R. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos da intoxicação por aceturato de diminazeno em cães. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 667–674, 2014.

FOGGIE, A. Studies on tick-borne fever in sheep. **Journal of general microbiology**, v. 3, n. 1, p. v, 1949.

FOGGIE, A. Studies on tick pyaemia and tick-borne fever. In: **Symp. Zoo. Soc. Lond**, v.6, p. 51-58, 1962.

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 77–85, 2005.

GOODMAN, J. L.; NELSON, C.; VITALE, B.; MADIGAN, J. E.; DUMLER, J. S.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 4, p. 209–215, 1996.

GRANICK, J. L.; ARMSTRONG, P. J.; BENDER, J. B. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 12, p. 1559–1565, 2009.

GRIBBLE, D.H. **Equine ehrlichiosis**. Tese de Doutorado. University of California, 1970.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American journal of veterinary research**, v. 36, n. 7, p. 937–940, 1975.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182–188, 1978.

HAUVIN, A. C.; OREAU, E. M.; ONNET, S. B.; LANTARD, O. P.; ALANDRIN, L. M. Review article *Babesia* and its hosts : adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary research**, v. 40, n. 2, p. 1-18, 2009.

HERRON, M. J.; ERICSON, M. E.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 374–382, 2005.

HODZIC, E.; FISH, D.; MARETZKI, C. M.; ARAVINDA, M.; SILVA, D.; FENG, S.; BARTHOLD, S. W.; SILVA, A. M. D. E. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3574–3578, 1998.

JAMES, S. P. **On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs.** [s.l.] Office of the superintendant of government printing, India, 1905.

JENSEN, J.; SIMON, D.; ESCOBAR, H. M.; 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.

KAWAHARA, M.; TAJIMA, T.; TORII, H.; YABUTANI, M.; ISHII, J.; HARASAWA, M.; ISOGAI, E.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1991–1993, 2009.

KEESING, F.; HERSH, M. H.; TIBBETTS, M.; MCHENRY, D. J.; DUERR, S.; BRUNNER, J.; KILLILEA, M.; LOGIUDICE, K.; SCHMIDT, K. A.; OSTFELD, R. S. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 12, p. 2013–2016, 2012.

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. **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. **Journal of Infectious Diseases**. v. 176, p. 1405–1409, 1997.

KOHN, B.; GALKE, D.; BEELITZ, P.; PFISTER, K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 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**, v. 91, n. 1, p. 71-76, 2011.

KONTOS, V. I.; PAPADOPOULOS, O.; FRENCH, T. W. Natural and experimental canine infections with a greek strain of *Ehrlichia platys*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 20, n. 4, p. 101–105, 1991.

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. 879,893-896, 2004.

LEWIS JR, G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American journal of veterinary research**, v. 38, n. 12, p. 1953–1955, 1977.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 809–820, 2003.

LIZ, J. S.; ANDERES, L.; SUMNER, J. W.; ROBERT, F.; GERN, L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M.; MASSUNG, R. F. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of clinical microbiology*, v. 38, n. 3, p. 1002-1007, 2000.

MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; WERTHER, K.; DE SOUSA, E.; GAVIOLI, F. A.; ALVES JUNIOR, J. R. F. Migratory and carnivorous birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, p. 705–708, 2012.

MACIEIRA, D. de B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. de M. F.; FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. de O.; ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44–48, 2005.

MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R. C.; RISTIC, M.; COX, D.; MCDADE, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 14, p. 853–856, 1987.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 103, 2013.

MAGNARELLI, L. A.; BUSHMICH, S. L.; IJDO, J. W.; FIKRIG, E. Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 11, p. 1895–1899, 2005.

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. 1757–63, 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.

MASSUNG, R. F.; SLATER, K.; OWENS, J. H.; NICHOLSON, W. L.; MATHER, T. N.; SOLBERG, V. B.; OLSON, J. G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of clinicalMicrobiology**, v. 36, n. 4, p. 1090–1095, 1998.

MASUZAWA, T.; KHARITONENKOV, I. G.; OKAMOTO, Y.; FUKUI, T.; OHASHI, N. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection

with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia) - A sympatric region for both tick species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 986–991, 2008.

MAURIN, M.; BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 413–415, 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. 405–412, 2010.

MOREIRA, S. M.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, v. 28, p. C2–C13, 2010.

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.

MUNDERLOH, U. G.; MADIGAN, J. E.; STEPHEN DUMLER, J.; GOODMAN, J. L.; HAYES, S. F.; BARLOUGH, J. E.; NELSON, C. M.; KURTTI, T. J. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 664–670, 1996.

MURATA, T.; INOUE, M.; TATEYAMA, S.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 5, p. 867–868, 1993.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; BILLINIS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 174–184, 2004.

O'DWYER, L. H.; SAITO, M. E.; HASEGAWA, M. Y.; KOHAYAGAWA, A. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 688–690, 2006.

OHASHI, N.; INAYOSHI, M.; KITAMURA, K.; KAWAMORI, F.; KAWAGUCHI, D.; NISHIMURA, Y.; NAITOU, H.; HIROI, M.; MASUZAWA, T. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1780–1783, 2005.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 55–56, 2009.

OLIVEIRA, A. C. de. Density gradient centrifugation, molecular biology and hematological changes in the diagnosis of canine hemoparasitoses. 2015. **Tese (doutorado)**, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

PALUDO, G. R.; DELL'PORTO, A.; DE CASTRO E TRINDADE, A. R.; MCMANUS, C.; FRIEDMAN, H. *Hepatozoon spp.*: Report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3–4, p. 243–248, 2003.

PARK, J.; CHOI, K. S.; DUMLER, J. S. Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. v. 71, n. 7, p. 4018–4025, 2003.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 110–117, 2006.

POITOUT, F. M.; SHINOZAKI, J. K.; PATRICK, J.; HOLLAND, C. J.; SHUKLA, S. K.; STOCKWELL, P. J. 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.; POLIN, H.; HUFNAGL, P.; HUFNAGL, P.; HAUNSCHMID, R.; HAUNSCHMID, R.; GRUBER, F.; GRUBER, F.; LADURNER, G.; 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.

POTTER, T. M.; MACINTIRE, D. K. *Hepatozoon americanum*: An emerging disease in the south-central/southeastern United States. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 70–76, 2010.

PRADO, L. G. Avaliação clínica e laboratorial de equídeos sororreagentes para *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Minas Gerais, Brasil. **Dissertacao de mestrado**, 2014

PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J. B.; DEPLAZES, P.; WOLFENSBERGER, 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.

RAMOS, C. A. M.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R., GUEDES JR, D. S., SOUZA, I. I., ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em

cães. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 58-62, 2009.

RAMOS, R. A. N.; LATROFA, M. S.; GIANNELLI, A.; LACASELLA, V.; CAMPBELL, B. E.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 285–288, 2014.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T.; BONES, E. R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 129-136, 2017.

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 of Medical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 1–5, 1996.

RIKIHISA, Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 469–489, 2011.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. Tribe II. Ehrlichieae Philip 1957, 948AL. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 1, p. 704–711, 1984.

ROLIM, M. F.; DE OLIVEIRA, F. C. R.; GRAÇA, F. A. S.; DA COSTA BRASIL, F. Serological evidence of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the rio de janeiro state mounted police bred in the urban zone. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 377–387, 2015.

RYMASZEWSKA, a.; GREUDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinarni**

Medicina, v. 11, n. 11, p. 573–584, 2008.

SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 4, p. 382–384, 1999.

SALVAGNI, C. A.; DAGNONE, A. S.; GOMES, T. S.; MOTA, J. S.; ANDRADE, G. M.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 19, n. 3, p. 135–40, 2010.

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. **The Veterinary record**, v. 164, n. 6, p. 168–71, 2009.

SANTOS, H. A.; THOMÉ, S. M. G.; BALDANI, C. D.; SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; PIRES, M. S.; VITARI, G. L. V.; COSTA, R. L.; SANTOS, T. M.; ANGELO, I. C.; SANTOS, L. A.; FACCINI, J. L. H.; MASSARD, C. L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 348, 2013.

SANTOS, H. A.; PIRES, M. S.; VILELA, J. a R.; SANTOS, T. M.; FACCINI, J. L. H.; BALDANI, C. D.; THOMÉ, S. M. G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C. L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 23, n. 4, p. 770–4, 2011.

SCAIFE, H.; WOLDEHIWET, Z.; HART, C. A.; EDWARDS, S. W. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1995–2001, 2003. SCORPIO, D. G.; VON

LOEWENICH, F. D.; GÖBEL, H.; BOGDAN, C.; DUMLER, J. S. Innate immune response to *Anaplasma phagocytophilum* contributes to hepatic injury. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 7, p. 806–809, 2006.

SEVERO, Maiara S. et al. Anaplasma. In: **Molecular Medical Microbiology (Second Edition)**. 2015. p. 2033-2042.

SILAGHI, C.; KAUFFMANN, M.; PASSOS, L. M. F.; PFISTER, K.; ZWEYGARTH, E. Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 204–208, 2011.

SILAGHI, C.; SKUBALLA, J.; THIEL, C.; PFISTER, K.; PETNEY, T.; PFÄFFLE, M.; TARASCHEWSKI, H.; PASSOS, L. M. F. The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 1, p. 49–54, 2012.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A.; MUNDIM, M. J. S.; GUIMARÃES, E. C. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 892–900, 2014.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, É. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 61–66, 2011.

SILVEIRA, J. A. G.; REIS, I. A.; ESTEVAM, L. G. T. M.; PINTO, M. C. C.; ZWEYGARTH, E.; PASSOS, L. M. F.; PAZ, G. F. Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 958–962, 2017.

SILVEIRA, J. A. G.; VALENTE, P. C. L. G.; PAES, P. R. O.; VASCONCELOS, A. V.; SILVESTRE, B. T.; RIBEIRO, M. F. B. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 242–245, 2015.

SOARES, J. F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P. E.; DA SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; LABRUNA, M. B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3–4, p. 203–208, 2011.

SOARES, R.; RAMOS, C. A.; PEDROSO, T.; BABO-TERRA, V.; CLEVELAND, H.; ARAÚJO, F. D. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 301-306, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; TROTTA, M.; CARLI, E.; CARCY, B.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3–4, p. 211–221, 2008.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Hepatozoon canis infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357-361, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. D. M.; CAMPOS, W. N. D. S.; MELO, A. L. T.; IGARASHI, M.; AMUDE, A. M.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 253–255, 2011.

STARKEY, L. A.; LITTLE, S. E. Canine tick-borne diseases. **Infection**, v. 5 August, p. 55–60, 2015.

STEFANIDESOVA, K.; KOCIANOVA, E.; BOLDIS, V.; KOSTANOVA, Z.; KANKA, P.; NEMETHOVA, D.; SPITALSKA, E. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. **European Journal of Wildlife Research**, v. 54, n. 3, p. 519–524, 2008.

STRINGER, R. E.; EDWARDS, S. W. Potentiation of the respiratory burst of human neutrophils by cycloheximide: Regulation of reactive oxidant production by a protein (s) with rapid turnover?. **Inflammation Research**, v. 163, p. 158–163, 1995.

TATCHELL, R. J.; MOORHOUSE, D. E. Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. **Science**, v. 167, n. 3920, p. 1002–1003, 1970.

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 Sciences**, v. 93, n. 12, p. 6209–6214, 1996.

THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In: [s.l.] Roca, 2007.

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.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. de C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v.

18, n. 3, p. 57–61, 2009.

VARGAS-HERNANDEZ, G.; ANDRÉ, M. R.; CENDALES, D. M.; SOUSA, K. C. M. D.; GONÇALVES, L. R.; RONDELLI, M. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 459-464, 2016.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1–2, p. 147–160, 2006.

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. da C.; DO NASCIMENTO, D. A. G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. dos S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Avaliação sorológica de patógenos transmitidos por carrapatos em cães urbanos e rurais do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 22, n. 1, p. 104–109, 2012.

VILLENEUVE, A.; GORING, J.; MARCOTTE, L.; OVERVELDE, S.; GORING, D. J.; MARCOTTE, L.; OVERVELDE, S. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* among dogs in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 5, p. 527, 2011.

WEBSTER, P.; IJDO, J. W.; CHICOINE, L. M.; FIKRIG, E. The agent of human granulocytic ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 9, p. 1932–1941, 1998.

WINJUM, N.; RILEY, L. K. In vitro proliferation of a canine granulocytic Ehrlichia. **Veterinary Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 355–362, 1993.

WOLDEHIWET, Z. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. **Journal of comparative pathology**, v. 97, n. 4, p. 481-485, 1987.

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 108-122, 2010..

WORMSER, G. P.; DUMLER, J. S.; TRIGIANI, E. R.; BAKKEN, J. S. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 1, p. 6–8, 2000.

YANCEY, C. B.; DINIZ, P. P. V. P.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; WIESEN, C.; QUROLLO, B. A. Doxycycline treatment efficacy in dogs with naturally occurring *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Journal of Small Animal Practice**, p. 1–8, 2017.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 241–248, 2000.

ZHAN, L.; CAO, W. C.; JIANG, J. F.; ZHANG, X. A.; LIU, Y. X.; WU, X. M.; ZHANG, W. Y.; ZHANG, P. H.; BIAN, C. L.; DUMLER, J. S.; YANG, H.; ZUO, S. Q.; CHU, C. Y.; LIU, W.; RICHARDUS, J. H.; HABBEMA, J. D. F. *Anaplasma phagocytophilum* from rodents and sheep, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 764–768, 2010.

ANEXO 1

Alinhamento múltiplo das sequencias obtidas neste trabalho (contig1) com outras depositadas no GenBank utilizando o programa MUSCLE 3.8. Sequencias comparadas: *Anaplasma phagocytophilum* strain GDR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KC455363.1); *Anaplasma phagocytophilum* strain GDR2 16S ribosomal RNA gene (KC455364); *Anaplasma platys* isolate CA07 16S ribosomal RNA gene, partial (KC989957); *Anaplasma platys* isolate WHARSA-47-1 16S ribosomal RNA gene (KU586031) e Uncultured *Anaplasma* sp. clone Labclin_DVT 16S ribosomal RNA gene (KP642756); contig1: sequencia obtida nesta pesquisa (*A. phagocytophilum*?)

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```
KC989957.1      TTTAACGGATTTATCTTTATAGCTTGCATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAA
KC455363.1      ---AACGGATTATCTTTATAGCTTGCATGATAACAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAA
KC455364.1      ---ACAGGATTATCTTTATAGCTTGCATGATAACAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAA
KU586031.1      -----ACGGATTTTATCATAGCTTGCATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAA
KP642756.1      -----GTAGCTTGCATGATAAAAAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAA
Contig1         -----
```

```
KC989957.1      TGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTAT
KC455363.1      TGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTAT
KC455364.1      TGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTAT
KU586031.1      TGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTAT
KP642756.1      TGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTAT
Contig1         ----TAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTAT
                *****
```

```
KC989957.1      AATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG
KC455363.1      AATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG
KC455364.1      AATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG
KU586031.1      AATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG
KP642756.1      AATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG
Contig1         AATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG
                *****
```

```
KC989957.1      GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
KC455363.1      GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
KC455364.1      GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
KU586031.1      GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
KP642756.1      GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
Contig1         GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAGTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
                *****
```

```
KC989957.1      ACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
KC455363.1      ACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
KC455364.1      ACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
KU586031.1      ACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
KP642756.1      ACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
Contig1         ACTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
                *****
```

```

KC989957.1      TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAC
KC455363.1      TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAC
KC455364.1      TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAC
KU586031.1      TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAC
KP642756.1      TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAC
Contig1         TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAC
                *****

KC989957.1      TCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAC TCCGTGCC
KC455363.1      TCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAC TCCGTGCC
KC455364.1      TCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAC TCCGTGCC
KU586031.1      TCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAC TCCGTGCC
KP642756.1      TCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAC TCCGTGCC
Contig1         TCTTTCAGTGGGGAAGATAATGACGGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAAC TCCGTGCC
                *****

KC989957.1      AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA
KC455363.1      AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA
KC455364.1      AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA
KU586031.1      AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA
KP642756.1      AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA
Contig1         AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA
                *****

KC989957.1      TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTA
KC455363.1      TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTA
KC455364.1      TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTA
KU586031.1      TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTA
KP642756.1      TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTA
Contig1         TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTA
                *****

KC989957.1      ATTACTGCA-----
KC455363.1      A-TACTGCC-----
KC455364.1      A-TACTGCC-----
KU586031.1      A-TACTGCCAGACTCGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATT
KP642756.1      A-TACTGCCAGACTCGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATT
Contig1         A-TACTG-----
                *   *****

```

ANEXO 2

VALORES DE REFERÊNCIA PARA HEMOGRAMA EM CÃES

Parâmetro (Unidade)	Intervalo de referência
Hematócrito (%)	37 – 55
Hemoglobina (g/dL)	12 – 18
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,5 – 8,5
(VCM) Volume corpuscular médio (fL)	60 – 72
(HCM) Hemoglobina corpuscular media (pg)	19,5 – 24,5
(CHCM) Concentração de hemoglobina corpuscular media (%)	34 - 38
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6 – 17
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3 – 11,5
Neutrófilos bastonetes($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0 – 0,3
Linfócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1 – 4,8
Monócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1 – 1,3
Eosinófilos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1 – 1,2
Plaquetas($\times 10^3/\mu\text{L}$)	200 – 500
Proteína plasmática (g/dL)	6 – 8

Fonte: (THRALL, 2007)