



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GISLAINE CRISTINA FERREIRA DA SILVA

**OCORRÊNCIA DE *EHRlichia canis* E *ANAPLASMA
PLATYS* EM CÃES DOMICILIADOS DA CIDADE DE
JATAIZINHO, PARANÁ.**

Londrina
2011

GISLAINE CRISTINA FERREIRA DA SILVA

**OCORRÊNCIA DE *EHRlichia canis* E *ANAPLASMA
PLATYS* EM CÃES DOMICILIADOS DA CIDADE DE
JATAIZINHO, PARANÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586o	<p>Silva, Gislaine Cristina Ferreira da. Ocorrência de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães domiciliados da cidade de Jataizinho, Paraná / Gislaine Cristina Ferreira da Silva. - Londrina, 2011. 47f. : il.</p> <p>Orientador: Odilon Vidotto. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Erliquiose canina - Teses. 2. Anaplasmoses - Teses. 3. Cão - Doenças - Teses. 4. Zoonoses - Teses. 5. Reação em cadeia de polimerase - Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 619:636.7</p>
-------	--

GISLAINE CRISTINA FERREIRA DA SILVA

**OCORRÊNCIA DE *EHRlichia canis* E *ANAPLASMA PLATYS* EM
CÃES DOMICILIADOS DA CIDADE DE JATAIZINHO, PARANÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal da Universidade
Estadual de Londrina

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Odilon Vidotto
UEL – Londrina – PR

Prof. Dra. Karina K. M. C. Flaiban
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Vamilton Alvares Santarém
UNOESTE – Presidente Prudente – PR

Londrina 29 de agosto de 2011

Dedico esta conquista aos meus pais, Marilene e Osvaldo, aos meus irmãos, Giovane e Jeferson, pois me deram asas; e aos meus amigos que sempre estão presentes quando estou com medo de voar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Odilon Vidotto pela confiança, acolhimento e orientação.

À professora Karina K. M. C. Flaiban e aos professores João Luis Garcia e Vamilton Santarém que contribuíram para realização e correção desse trabalho.

Aos amigos Aline Benitez, Aline Giroto, Alessandra Taroda, Maria Carla e Alexei pelas amostras e toda ajuda na realização desse projeto.

À minha prima Gisele pela paciência e imensa contribuição na parte escrita desse trabalho.

À professora Mara R. S. Balarin que confiou em meu trabalho e me orientou durante a residência, abrindo assim as portas desta instituição para minha formação profissional.

Ao Ricardinho (Jonatas) e André, companheiros de república pela convivência harmônica, palavras de incentivo e divisão de contas (rs).

Aos meus amigos, como é difícil identificá-los nos dias de hoje, obrigada por me ajudarem com relação ao mestrado, mas principalmente pelas horas que me fizeram sorrir, quando isso parecia impossível.

Às minhas irmãs de alma que me ajudaram e me ajudam cada uma de seu jeito, Rita, Aline, Alê, Marina, Gisele e Lili, obrigada por fazerem parte da minha vida e torná-la mais feliz.

À minha “Grande Família” sei que a minha alegria é compartilhada por tios e primos que sempre rezam e torcem por mim.

Aos meus pais, pois não só me deram a vida, mas tudo de melhor que ela oferece, amor, muito amor, educação, valores que formam o meu caráter, além disso, me deram o meu maior tesouro, chamados Giovanni e Jeferson, os melhores irmãos do mundo e a eles eu agradeço por todas as minhas conquistas pois são os meus maiores incentivadores.

A Deus, por me acompanhar em toda minha vida e por ter colocado cada pessoa dessa no meu caminho. Valeu aí papai do céu!

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei de mais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe e só levo a essa certeza de que muito pouco eu sei ou nada sei.....”

Renato Teixeira/ Almir Sater

SILVA, Gislaine Cristina Ferreira. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães domiciliados da cidade de Jataizinho, Paraná.** 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina. 2011.

RESUMO

A erliquiose canina é uma doença infecciosa, causada por bactérias gram-negativas, pertencentes à Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, Gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* são organismos intracelulares obrigatórios, organizados em agrupamentos denominados mórulas, localizados comumente em leucócitos e plaquetas, respectivamente, existindo a possibilidade de infecções concomitantes. A transmissão da enfermidade ocorre pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A erliquiose é uma zoonose e nos últimos anos vem apresentando um aumento significativo no número de animais infectados. O cão pode estar infectado e não apresentar nenhum sinal clínico durante semanas e até por anos, entretanto, ele é um portador e disseminador da doença. O encontro de inclusões ou mórulas em leucócitos e plaquetas ao exame de esfregaço sanguíneo, na maioria das vezes é insatisfatório, podendo ser complementado com a realização de técnicas moleculares de diagnóstico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença de *E. canis* e *A. platys* em amostras sanguíneas, coletadas em cães domiciliados da cidade de Jataizinho, Paraná. Durante os meses de julho e agosto de 2010 foram coletadas, 256 amostras de sangue de cães. O material foi submetido à extração de DNA e posteriormente PCR, utilizando-se primers que amplificam o gene de virulência VirB9 de *E. canis* e o gene 16S rRNA, parte da sequência de *A. platys*. Das 256 amostras analisadas, 42 (16,4%) amplificaram um fragmento de 959 pb de *E. canis*, 49 (19,4%), amplificaram um fragmento de 504 pb de *A. platys* e 14 (5,47%) apresentaram-se co-infectadas. Não foi observada associação com as variáveis sexo, idade, acesso à rua e presença de carrapatos no momento da coleta de sangue. A infecção por *E. canis* teve relação com anemia e com trombocitopenia, enquanto que a infecção por *A. platys* apenas com trombocitopenia. Portanto, essas doenças devem estar entre os diagnósticos diferenciais quando estas alterações hematológicas forem encontradas em exames laboratoriais. Os dados apresentados demonstram a presença dos agentes estudados na cidade de Jataizinho com provável ocorrência de casos clínicos em cães e risco potencial de infecção em humanos.

Palavras-chave: Erliquiose monocítica canina. Anaplasrose trombocítica canina. Diagnóstico molecular. Anemia e trombocitopenia.

SILVA, Gislaine Cristina Ferreira. **Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domiciled dogs from Jataizinho city, Paraná.** 2011. 47f. Dissertation (Master in Animal Science) – Londrina State University, 2011.

ABSTRACT

The canine ehrlichiosis is an infectious disease caused by gram-negative coccoid bacteria which belongs to the Order Rickettsiales, Anaplasmataceae Family, genus *Ehrlichia* and *Anaplasma*. *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* are obligate intracellular organisms, organized in clusters called morulae, commonly found on leukocytes and thrombocytes, respectively, with the possibility of concomitant infections. The transmission of the disease occurs through the bite of the tick *Rhipicephalus sanguineus*, which performs the blood meal, and inoculates salivary secretions containing these infectious agents. The ehrlichiosis is a zoonotic disease and in recent years has shown a significant increase in the number of infected animals in various regions of Brazil and the world. The dog may be infected and shows no clinical symptoms for weeks or even years. However, it is a carrier and disseminator of the disease. The finding of intracytoplasmic inclusions or morulae in cells infected by blood smear examination, in most cases, is unsatisfactory and can be complemented with the implementation of molecular diagnostic assays. Thus, the aim of this study was to investigate by polymerase chain reaction (PCR) the presence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in blood samples collected in domiciled dogs Jataizinho city, Paraná State. During the months of July and August, 2010, 256 blood samples from the dogs were collected in individual tubes containing EDTA. The material was subjected to DNA extraction and subsequent PCR, using primers that amplify the *E. canis* VirB9 gene of virulence and part of the sequence of *A. platys* the 16S rRNA gene. From the 256 samples analyzed, 42 (16.4%) amplified a 959 bp fragment of *E. canis*, 49 (19.4%) amplified a 504 bp fragment of *A. platys* and 14 (5.47%) were coinfecting. There was no significant association with gender, age, street access and the presence of ticks at the time of blood collection. Infection with *E. canis* was related to anemia and thrombocytopenia while infection by *A. platys* was related to thrombocytopenia only, so these diseases should be among the differential diagnoses when these hematologic changes are found in laboratory tests. The results demonstrate the presence of the agents studied in the city of Jataizinho with probable occurrence of clinical cases in dogs and potential risk of human infection.

Keywords: Canine Monocytic Ehrlichiosis. Canine thrombocytic anaplasmosis. Molecular diagnostics. Anemia. Thrombocytopenia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Visualização em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia da polimerase com primers específicos para *Ehrlichia canis*.....40
- Figura 2** – Visualização em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia da polimerase com primers específicos para *Anaplasma platys*.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Análise da associação entre <i>Ehrlichia canis</i> e possíveis fatores de risco em cães domiciliados de Jataizinho –PR.....	41
Tabela 2 –Análise da associação entre <i>Anaplasma platys</i> e possíveis fatores de risco em cães domiciliados de Jataizinho – PR.....	42
Tabela 3 –Proporção de anemia e trombocitopenia entre as amostras positivas e negativas para <i>Ehrlichia canis</i> nos cães domiciliados de Jataizinho – PR	42
Tabela 4 –Proporção de anemia e trombocitopenia entre as amostras positivas e negativas para <i>Anaplasma platys</i> nos cães domiciliados de Jataizinho – PR.....	42

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 ERLIQUIOSE E ANAPLASMOSE CANINA.....	11
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	11
1.3 EHRLICHIA CANIS.....	12
1.3.1 Distribuição Geográfica.....	13
1.3.2 Transmissão.....	13
1.3.3 Patogenia E Sinais Clínicos.....	13
1.3.4 Alterações Hematológicas.....	15
1.4 ANAPLASMA PLATYS.....	16
1.4.1 Distribuição Geográfica.....	16
1.4.2 Transmissão.....	16
1.4.3 Patogenia E Sinais Clínicos.....	17
1.4.4 Alterações Hematológicas.....	18
1.5 DIAGNÓSTICO DE E. CANIS E A. PLATYS.....	18
1.6 SAÚDE PÚBLICA.....	20
1.7 REFERENCIAS.....	21
2 OBJETIVOS	30
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	31
3.1 INTRODUÇÃO.....	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.2.1 Área De Estudo E Amostras.....	33
3.2.2 Exames Hematológicos.....	33
3.2.3 Extração De DNA.....	33
3.2.4 Reação Em Cadeia Da Polimerase.....	34
3.2.5 Detecção De Produtos Amplificados.....	34
3.2.6 Análise Estatística.....	35
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.4 CONCLUSÃO.....	40
3.5 REFERÊNCIAS.....	43

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ERLIQUIOSE E ANAPLASMOSE CANINA

A erliquiose e a anaplasnose canina são doenças causadas por organismos bacterianos gram-negativos, intracelulares obrigatórios, que infectam leucócitos e plaquetas (RIKIHISA, 1991; MCBRIDE et al., 1996; COHN, 2003). Têm grande importância na clínica de pequenos animais e na saúde pública por se tratar de enfermidades cada vez mais prevalentes em cães podendo também acometer o homem (KAKOMA et al., 1994; da COSTA et al., 2006; DOUDIER et al., 2010). Dentro do gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma*, são capazes de causar doença no homem as espécies *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. canis*. No entanto, esta última não foi suficientemente estudada para que se comprove seu potencial zoonótico (DUMLER et al., 2007).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

A taxonomia dos membros pertencentes à Ordem Rickettsiales tem sofrido significativa reorganização na última década. A sequência homóloga do RNA ribossômico (rRNA) foi utilizada para determinar o parentesco genético dos organismos que estão sendo reclassificados na Família Rickettsiaceae com os gêneros *Rickettsia* e *Orientia*, os quais compreendem bactérias intracelulares obrigatórias que crescem livremente no citoplasma de células hospedeiras eucarióticas, e na Família *Anaplasmataceae* que inclui todas as espécies de α -protobactérias contidas nos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, que replicam-se em compartimentos intravacuolares no interior das células do hospedeiro (DUMLER et al., 2001).

As principais espécies de *Ehrlichia* que infectam cães são *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. canis* e de *Anaplasma* são *A. phagocytophilum* e *A. platys*. A espécie *E. chaffeensis*, com tropismo por células mononucleares, foi primeiramente documentada em humanos e posteriormente em cães na América do Norte (DAWSON et al., 1996; NEER; HARRUS, 2006). *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* estão relacionados com a forma granulocítica da erliquiose (GOLDMAN et al., 1998; DAGNONE et al., 2001; OLIVEIRA, 2009).

E. canis é o principal agente causador da erliquiose canina, e, assim como a *E. chaffeensis*, também parasita células mononucleares. No entanto, é mais prevalente (SKOTARCZAK, 2003, VIEIRA et al., 2011). *A. platys* parasita plaquetas, e é conhecida por ser o agente causador da trombocitopenia cíclica nos cães, e assim como *E. canis*, tem distribuição mundial (SIMPSON et al., 1991; HARRUS et al., 1997; SAINZ et al., 1999; BREITSCHWERDT, 2000; YABSLEY et al., 2008).

A co-infecção de *A. platys* e *E. canis* é frequente, pois acredita-se que sejam transmitidas pelo mesmo vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (KORDICK et al., 1999; BREITSCHWERDT, 2000; SUKSAWAT et al., 2001ab).

1.3 EHRLICHIA CANIS

Ehrlichia canis é o agente causador da erliquiose monocítica canina (EMC) e foi identificada pela primeira vez na Argélia em monócitos de cães (*Canis familiaris*) infestados por carrapatos *R. sanguineus*, que apresentavam quadros agudos de febre e anemia, ocasião em que foi denominada *Rickettsia canis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935). Neitz e Thomas (1938) descreveram uma epidemia de *R. canis* no Parque Nacional Kruger, África, onde esfregaços sanguíneos de cães selvagens (*Lycoon pictus*) apresentavam inclusões que correspondiam à descrição feita em 1935. A reclassificação se deu em 1945 por Mashkovsky, quando passou a ser chamada *E. canis* (MACHADO, 2004).

Durante a Guerra do Vietnã, a doença teve destaque mundial, quando cerca de 300 cães militares americanos desenvolveram uma enfermidade hemorrágica fatal, chamada pancitopenia tropical canina (HUXSOLL et al., 1970; BREITSCHWERDT et al., 1998; MACHADO, 2004; VIEIRA et al., 2011). Entretanto, passou a ser mais pesquisada quando foi relacionada com infecções em humanos, em 1987, nos Estados Unidos (DUMLER; BAKKEN, 1998).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em Belo Horizonte, com a observação de inclusões em linfócito (COSTA et al., 1973). Depois disso houve vários relatos da doença por todo país (VIEIRA et al., 2011).

1.3.1 Distribuição Geográfica

A EMC tem distribuição mundial, particularmente frequente em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em áreas urbanas e suburbanas, devido à maior concentração do seu principal vetor, o *R. sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001; SOUZA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

No Brasil, a EMC é considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Dados nacionais relataram que 10 a 30% dos cães provenientes de hospitais veterinários apresentam sorologia e/ou PCR positiva para o agente (DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; UENO et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011).

1.3.2 Transmissão

O principal transmissor da EMC é o *R. sanguineus* (DAGNONE et al., 2001; MACHADO, 2004). Como este carrapato também é responsável pela transmissão de outros hemoparasitas, é comum encontrar animais co-infectados com *Babesia canis*, *A. platys*, *Bartonella vinsonii*, *Hepatozoon canis* e outras espécies de *Ehrlichia* (KORDICK et al., 1999; SOLANO-GALEGO et al., 2006; YABSLEY et al., 2008; DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al. 2010).

A transmissão da *Ehrlichia* ocorre por via transtadiária, ou seja, o carrapato pode adquirir a infecção nos estágios de larva ou ninfa ao se alimentar com o sangue de um animal infectado e transmiti-la a um animal sadio durante a alimentação subsequente. Esse fenômeno permite que os vetores transmitam as bactérias aos cães durante um longo período devido ao fato de o ciclo biológico do *R. sanguineus* incluir três hospedeiros (GREENE; HARVEY, 2006; HARRUS et al., 1997).

1.3.3 Patogenia e Sinais Clínicos

A EMC é caracterizada por ser multissistêmica com período de incubação variando de uma a três semanas (CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985; GREENE; HARVEY, 2006; NEER; HARRUS, 2006). De acordo com as alterações clínicas e hematológicas, a doença pode evoluir para três estágios

consecutivos da infecção: aguda, subclínica ou assintomática e crônica (RIKIHISA, 1991; HARRUS et al., 1997; MOREIRA et al., 2003; NEER; HARRUS, 2006).

Fase aguda: pode durar de duas a quatro semanas. Nesta fase as bactérias se multiplicam no interior de células do sistema fagocítico mononuclear em órgãos como fígado, baço e linfonodos, ocasionando hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatias; podem ainda multiplicar-se nas células da medula óssea, resultando em hipoplasia das linhagens afetadas (DAGNONE et al., 2001; CASTRO et al., 2004; NEER; HARRUS, 2006).

As células infectadas são transportadas, através da corrente sanguínea, para outros órgãos, especialmente para os pulmões, rins e meninges, e se aderem ao endotélio vascular, levando à vasculite (BREITSCHWERDT, 2000). A vasculite e os mecanismos imunomediados induzem a trombocitopenia e possíveis quadros hemorrágicos (NEER; HARRUS; 2006).

Nesta fase os sinais clínicos são inespecíficos e incluem febre, secreção ocular e nasal, anorexia, depressão, perda de peso, dispnéia, poliartrite e sinais neurológicos e musculares (CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985; GLAUS; JAGGY, 1992; BREITSCHWERDT, 2000; HARRUS et al., 1997). Geralmente, os sinais clínicos se resolvem sem tratamento, podendo o cão permanecer assintomático ou desenvolver a fase crônica (NEER; HARRUS, 2006).

Fase subclínica ou assintomática: instala-se quando o animal sobrevive à fase aguda, pode durar meses ou anos e está associada à persistência de *E. canis* no hospedeiro, que apresenta altos níveis de anticorpos no sangue (ANDEREG; PASSOS, 1999). Durante esta fase, apesar de os animais serem assintomáticos, pode-se observar algumas alterações neurológicas e hematológicas, como trombocitopenia, leucopenia e neutropenia (BREITSCHWERDT, 2000). Estímulos estressantes ou tratamento imunossupressor durante esta fase podem provocar a progressão para a fase crônica (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986).

Fase crônica: caracteriza-se pela incapacidade do sistema imune do hospedeiro em eliminar o microrganismo. Esta fase varia de suave a severa e é dependente de fatores como idade, imunocompetência, virulência da cepa e infecções concomitantes (ANDEREG; PASSOS, 1999). Os sinais clínicos apresentados nesta fase são reflexos das alterações fisiopatológicas resultantes da grave anemia e da infiltração perivascular de células linforreticulares e plasmócitos

em diversos órgãos (SHERDING, 2008). O óbito ocorre pela hemorragia sistêmica associada a infecções secundárias (NEER; HARRUS, 2006).

1.3.4 Alterações Hematológicas

As principais alterações hematológicas encontradas em cães infectados por *E. canis* incluem trombocitopenia, anemia e leucopenia (HARRUS et al., 1999; DAGNONE et al., 2001; BULLA et al., 2004; MACHADO, 2004).

A trombocitopenia é considerada a anormalidade mais comum em animais com erliquiose. Já na segunda semana pós infecção observa-se queda no número de plaquetas, que permanece baixo durante as fases aguda e crônica da doença (OLIVEIRA et al., 2000; MOREIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004). Esta alteração envolve vários processos, como consumo de plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, aumento do sequestro esplênico, destruição imunomediada (principalmente na fase aguda), decréscimo na produção de plaquetas devido à hipoplasia medular (fase crônica) e/ou diminuição da vida média das células (HARRUS et al., 1999; WARNER et al., 2000; BULLA et al., 2004). Além da queda no seu número, há também o aumento do tamanho das plaquetas, denominados mega ou macroplaquetas, no sangue periférico (WARNER et al., 1997).

Acredita-se que o mecanismo imunológico responsável pela indução da leucopenia seja também responsável pela anemia normocítica normocrômica. Os eritrócitos seriam fagocitados e lisados pelo complemento devido a uma reação de hipersensibilidade do tipo II, junto com hemorragias e com a diminuição de produção pela medula óssea. A vasculite generalizada está associada à produção de interleucina-1 (IL-1), a qual desempenha uma importante função na marginalização e adesão dos leucócitos na parede vascular, e, com isso, leva ao maior acúmulo de células no foco da inflamação e à consequente queda no número dessas células na circulação sanguínea (MOREIRA et al., 2003; NEER; HARRUS, 2006).

Na fase crônica pode ocorrer hipoplasia da medula óssea e deteriorização da produção medular de todos os elementos do sangue, o que resulta em pancitopenia (NEER; HARRUS, 2006; HARRUS et al., 2004).

1.4 ANAPLASMA PLATYS

Anaplasma platys foi relatada pela primeira vez por Harvey; Simpson e Gaskin (1978), nos Estados Unidos, ao observarem mórulas em plaquetas de um cão trombocitopênico, ocasião em que foi denominada *Ehrlichia platys*. A nova denominação foi proposta cinco anos mais tarde, devido ao agente não apresentar semelhança antigênica com *E. canis* (FRENCH; HARVEY, 1983). É uma bactéria que infecta apenas plaquetas de cães, induzindo a doença conhecida como trombocitopenia cíclica canina ou erliquiose trombocítica canina (SOUSA et al., 2009).

1.4.1 Distribuição Geográfica

São poucos os estudos epizootiológicos, mas acredita-se que sua distribuição geográfica seja semelhante a de outras espécies de rickettsias (BRADFIELD; VORE; PRYOR, 1996).

O parasita já foi descrito em várias partes do mundo, como nos EUA, Grécia, França, Itália, Israel, China, Japão, Tailândia e Venezuela (ABARCA et al., 2007) e no Brasil vem sendo relatada em cães de várias regiões (GASPARINI et al., 2008; DAGNONE et al., 2009; FERREIRA et al., 2008; CARDOZO et al., 2009; SOUSA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; RAMOS et al., 2010).

1.4.2 Transmissão

Embora a transmissão experimental de *A. platys* pelo *R. sanguineus* tenha falhado (SIMPSON et al., 1991), o carrapato é apontado como o principal transmissor para cães em diversas regiões do mundo (KORDICK et al., 1999; SANOGO et al., 2003; SPARAGANO et al., 2003; YABSLEY et al., 2008; SOUSA et al., 2009). Além disso, o DNA de *A. platys* já foi detectado em carrapatos desta espécie (INOKUMA; RAOUL; BROUQUI, 2000; SPARAGANO et al., 2003; FOONGLADDA et al., 2011).

O *R. sanguineus* possui ampla distribuição geográfica e é o vetor de outros hemoparasitas tais como *E. canis* e *B. canis*. A co-infecção destes agentes com *A. platys* é um achado frequente (SUKSAWAT et al., 2001ab; HUANG et al.,

2005; SANOGO et al., 2003; SANTOS et al., 2009;), fato que reforça a hipótese de que o vetor seja o mesmo.

A detecção de DNA de *A. platys* em filhotes e suas mães levanta a possibilidade de transmissão transplacentária, contudo há de se realizar estudos mais aprofundados para sua confirmação (ALMEIDA et al., 2010).

1.4.3 Patogenia E Sinais Clínicos

O período de incubação da anaplasose varia de oito a quinze dias. A infecção aguda caracteriza-se pela parasitemia cíclica das plaquetas, onde uma alta porcentagem apresenta-se infectada. Em alguns dias ocorre a trombocitopenia que pode ser intensa. Nesta fase, tornam-se mínimas as chances de visualização do parasita na circulação. Após um período de trombocitopenia, as plaquetas tendem a retornar aos valores normais após três a quatro dias. Estas fases acontecem em intervalos de uma a duas semanas (WOODY; HOSKINS, 1991; INOKUMA; RAOUL; BROUQUI, 2000; HARVEY, 2006).

Os sinais clínicos variam com a severidade da infecção, com a resposta imunológica do hospedeiro, com os órgãos atingidos e com a presença de co-infecção com outros microrganismos (HARVEY, 2006).

A existência de mais de uma cepa de *A. platys* circulando na América Latina poderia explicar as diferenças na gravidade da doença. No Brasil e na Venezuela apresenta-se leve ou assintomática, enquanto que no Chile as manifestações clínicas são consideradas mais graves (ABARCA et al., 2007; CARDOZO et al., 2009).

Anaplasma platys causa trombocitopenia que pode ser grave o suficiente para resultar em sangramento, incluindo petéquias e equimoses, mas a maioria dos cães consegue controlar a infecção imunologicamente e esses sinais podem não aparecer (HARVEY, 2006; GAUNT et al., 2010). Em geral, os sinais são inespecíficos, como anorexia, letargia, mucosas hipocoradas e febre (RIKIHISA, 1991; HARRUS et al., 1997).

1.4.4 Alterações Hematológicas

A principal alteração hematológica da infecção por *A. platys* é a trombocitopenia (DAGNONE et al., 2003; SOUSA et al., 2009). Em alguns casos observa-se anemia e leucopenia (WOODY; HOSKINS, 1991; SHERDING, 2008).

As plaquetas parasitadas e a trombocitopenia diminuem durante a infecção crônica, resultando em raras plaquetas parasitadas no esfregaço sanguíneo (FRENCH; HARVEY, 1983; HARVEY, 2006).

A trombocitopenia associada a *A. platys* é classificada como regenerativa, pois é observada uma hiperplasia megacariocítica na medula óssea de cães infectados (BAKER et al., 1987).

1.5 DIAGNÓSTICO DE *E. CANIS* E *A. PLATYS*

1.5.1 Microscopia Óptica

O método de diagnóstico usado rotineiramente é a pesquisa do parasita em esfregaço sanguíneo, observado como inclusões em leucócitos (*E. canis*) e em plaquetas (*A. platys*) (FRENCH; HARVEY, 1983; BREITSCHWERDT, 2000; HARVEY, 2006).

As mórulas de *E. canis* são difíceis de serem detectadas, pois aparecem em baixas concentrações no sangue circulante (DAGNONE et al., 2001; HARVEY, 2006; NAKAGHI et al., 2008; RAMOS et al., 2009). Em um estudo realizado em cães com infecção por *E. canis* na fase aguda da doença, apenas 4% dos esfregaços tiveram a presença de mórulas (WOODY; HOSKINS, 1991); em outro, onde comparou-se o método de microscopia com a PCR, a positividade foi de 9% e 57%, respectivamente (RAMOS et al., 2010).

Com relação ao *A. platys*, o caráter cíclico da trombocitopenia dificulta o diagnóstico direto. Além disso, quando ocorre ativação plaquetária e há uma diferença na morfologia dos grânulos, estes podem ser confundidos com inclusões do parasita (SIMPSON; GAUNT, 1991; HARVEY, 2006).

1.5.2 Sorologia

Muitos testes sorológicos estão disponíveis para a detecção dos agentes da família Anaplasmataceae, tais como fixação do complemento, hemaglutinação indireta, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunenzimático (ELISA), Dot-blot ELISA e Western blot.

Os testes sorológicos, em geral, são limitados pela deficiência na detecção de infecções agudas, pela dificuldade de diferenciar infecção por exposição primária e pela possibilidade de ocorrência de reações cruzadas entre diferentes espécies (IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA 1994, SHAW et al., 2001). Um teste isolado, portanto, pode não indicar infecção e sim exposição ao agente e este fato aumenta a importância do suporte clínico ao interpretar os resultados dos exames (RIKIHISA, 1991).

1.5.3 Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI é a principal técnica sorológica usada para a detecção de anticorpos séricos, porém a maior desvantagem deste teste é o grande número de reações inespecíficas originadas por antígenos comuns a outros agentes do mesmo grupo (RIKIHISA, 1991; DUMLER et al., 1995; NEER; HARRUS, 2006).

A detecção de anticorpo para agentes da família Anaplasmataceae também pode ser feita através do teste de Dot-blot ELISA (FRENCH; HARVEY, 1983; TRAPP et al., 2006). No entanto já foi descrita a ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *A. platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *A. phagocytophilum* (FERREIRA et al., 2008).

As técnicas sorológicas podem ser empregadas como testes confirmatórios de diagnóstico para infecções por rickettsias (COHN, 2003; TRAPP et al., 2006; YABSLEY et al., 2008); entretanto, apesar de apresentarem alta sensibilidade, esses testes podem levar a resultados falsos positivos, pois os anticorpos específicos podem permanecer por até 11 meses pós o tratamento e a cura e falsos negativos nas infecções agudas (RIKIHISA, 1991; COHN, 2003; NAKAGHI et al., 2008).

1.5.4 Diagnóstico Molecular

A PCR é uma das técnicas mais empregadas nas diversas áreas do diagnóstico molecular. Sua tecnologia também é bastante flexível, o que permite uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da PCR, podem ser citadas nested PCR, multiplex PCR e PCR em tempo real. O nested PCR emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de primers internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método. A PCR multiplex é utilizada para detectar múltiplas seqüências-alvo numa mesma amostra. Já a PCR em tempo real é empregada para quantificação de amostras (MOLINA; TOBO, 2004).

Os testes moleculares são rápidos, sensíveis e específicos para detecção de *Rickettsias* (IQBAL et al., 1994; MURPHY et al., 1998; MACIEIRA et al., 2005; FENOLLAR; RAOULT, 2004), permitem determinar a espécie presente, bem como a presença de co-infecção por duas ou mais espécies (AGUIRRE et al., 2006; NAKAGHI et al. 2008; BANETH et al., 2009; RAMOS et al., 2009). Esses testes têm sido aplicados com frequência no diagnóstico das *Rickettsioses* (MACHADO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; SANTOS et al., 2009; RAMOS et al., 2010).

1.6 SAÚDE PÚBLICA

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a erliquiose é uma zoonose, sendo *E. chaffeensis* e *E. ewingii* as espécies tradicionalmente envolvidas nas infecções humanas. No entanto, *E. canis* tem sido relatada como responsável por causar infecções em pacientes na Venezuela (PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996; PEREZ et al., 2006; DUMLER et al., 2007).

Nos últimos anos, a erliquiose humana tem chamado a atenção dos órgãos de saúde dos Estados Unidos, pois a incidência da doença passou de menos de 1 caso por milhão de pessoas em 2000 para 3,4 casos por milhão de pessoas em 2008, sendo mais prevalente em pessoas acima de 50 anos, do sexo masculino e que tiveram contato com carrapatos. Pessoas com sistema imunológico comprometido podem desenvolver uma forma mais grave da doença (DUMLER et al., 2007; CDC, 2008).

A infecção em humanos por *E. canis* teve sua primeira descrição na Venezuela Venezuela (PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996). Em outro estudo realizado neste mesmo país, a mesma cepa de *E. canis* foi encontrada infectando o homem, o cão e o carrapato, sugerindo que cães infectados cronicamente servem como reservatório deste agente para infecção em humanos e que o *R. sanguineus* atua como vetor (UNVER et al. 2001).

Dentre os humanos acometidos por *E. canis* que foram avaliados por Perez et al. (2006), na Venezuela, todos tiveram contato com cães, apoiando a idéia do seu potencial zoonótico. Esses autores afirmaram, ainda, que pacientes com episódios febris sem etiologia conhecida são observados frequentemente nas regiões tropicais, e isto justifica a inclusão da erliquiose canina, por *E. canis*, no diagnóstico diferencial.

Infecções humanas com *A. platys* são raras, mas a detecção de organismos semelhantes ao agente em plaquetas já foi relatada (ARRAGA-ALVARADO et al., 1999, TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004).

Com o crescente aumento na prevalência das doenças causadas por riquetsias com possível potencial zoonótico, tornam-se essenciais os estudos referentes aos agentes envolvidos nestas enfermidades. Ao estudar a ocorrência de *E. canis* e *A. platys* em cães domiciliados, que, portanto, estão em estreito contato e são potenciais fontes de infecção para humanos, o presente trabalho pode contribuir com o conhecimento sobre a epidemiologia destes agentes.

1.7 REFERÊNCIAS

ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; PERRET, C.; GUERRERO, J.; GODOY, P.; VELOZ, A.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; LEÓN, U.; GUTJAHR, C.; AZÓCAR, T. *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1392-1395, 2007.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A.; RUIZ, L.; AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 197–200, 2006.

ALMEIDA, A. B. F.; PAULA, D. A. J.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cadelas e neonatos de Cuiabá, Mato Grosso. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 3, p. 127-134, 2010.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina – a revisão. **Clínica Veterinária**, v. 4, n. 19, p. 31-38, 1999.

ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. Fine structural characterisation of a *Rickettsia*-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 991–997, 1999.

AZEVEDO, S. S.; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F.; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. F.; UCHÔA, I. C. P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.

BAKER, D. C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 5, p. 445-453, 1987.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 321–325, 2009.

BRADFIELD, J. F.; VORE, S. J.; PRYOR JR, W. H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. **Laboratory Animal Science**, v. 46, p. 565–568, 1996.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): **Infections diseases of the dog and cat**. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 2v., v.1, cap. 86, p.400-407.

BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., HANCOCK S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 2645-2651, 1998.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO, J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

CARDOZO, G. P.; OLIVEIRA, L.P.; MANSUR, M. A. B.; SANTOS, E. V.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. Molecular characterisation of two strains of *Anaplasma platys* in Brazil. **Veterinary Record**, v. 164, p. 338-339, 2009.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.

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

CDC, Annual cases of Ehrlichiosis in the United States. Center Control Diseases. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ehrlichiosis>. Acesso em jul. de 2011.

- CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, p. 47-50, 1986.
- CODNER, E. C.; ROBERTS, R. E.; AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, p. 166-169, 1985.
- COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33,n. 4, p. 863–884, 2003.
- COSTA, J. O.; BATISTA JÚNIOR, J. A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, P. M. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.
- DA COSTA, P. S. G.; VALLE, L. M.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. More about Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological evidence of nine new cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, n. 1, p. 7-10, 2006.
- DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191, 2001.
- DAWSON, J. E.; BIGGIE K. L.; WARNER C. K.; COOKSON K.; JENKINS, S.; LEVINE, J. F.; OLSON, J. G. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n.12, p. 1175-1179, 1996.
- DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique de ses Filiales**. v. 28, p. 418-419, 1935.
- DOUDIER, B.; OLANO, J.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 149–154, 2010.
- DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J. E. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic ehrlichia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1098–1103, 1995.
- DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S. Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. **Annual review of medicine**, v. 49, p. 201-213, 1998.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BECKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R.. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J. S. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, suppl. 1, p. 45-51, 2007.

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

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; AZEVEDO, R. R. M.; RODRIGUES, I. L. F.; ALMOSNY, N. R. P. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães pcr-positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 5-8, 2008.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American Journal Veterinary Research**, v. 44, p. 2407-2411, 1983.

FOONGLADDA, S.; INTHAWONG, D.; KOSITANONT, U.; GAYWEE, J. *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Bartonella* in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 1-8, 2011.

GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C. Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. In: Program & Resumos do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul, 2008, Curitiba. XV **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Curitiba, 2008. v. 15.

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. P. V. P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2010.

GLAUS, T.; JAGGY, A. Ehrlichiosis in dogs: literature review and case description. **Schweiz Arch Für Tierheilkunde**, v. 134, p. 319-323, 1992.

GOLDMAN, E. E.; BREITSCHWERDT, E. B.; GRINDEM, C. B.; HEGARTY, B. C.; WALLS, J. J.; DUMLER, J. S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, p. 61-70, 1998.

GREENE C. E., HARVEY J. W.: Canine ehrlichiosis. *In: Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat*, ed. Greene CE, p. 545-561. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 2006.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, p. 247-50, 1997.

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

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S.. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection, **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

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, p. 182-188, 1978.

HARVEY, J. W. Trombocytotropic anaplasmosis (*A. platys* (*E. platys*) infection). In GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: GREENE, 2006. p. 203-216.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M. J.; ORELLANA, N. G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 211-216, 2005.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; AMYX, H. L.; FERGUSON, J. A. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **Journal of Wildlife Diseases**.v. 6 p. 220-225, 1970.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219-4222, 2000.

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

KAKOMA, I.; HANSEN, R. D.; ANDERSON, B. E.; HANLEY, T. A.; SIMS, K. G.; LIU, L.; BELLAMY, C.; LONG, M. T.; BAEK, B. K. Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.1, p. 170-175, 1994.

KORDICK, S. K.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK, K. L.; COLITZ, C. M.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY, J. M.; RUMBOUGH, R.; MCPHERSON, J. T.; MACCORMACK, J. N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, 1999.

LABARTHE, N. V.; PEREIRA, M. C.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães. **Clinica Veterinaria**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M. B.; DAGNONE, A. S.; SZABO, M. P. J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*), **Veterinary Parasitology**, v. 132, n. 1-3, p. 262-266, 2006.

MACHADO, R. Z. Erlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004.

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

McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441-447, 1996.

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

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.

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

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In GREENE, C. E. **Infections diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: GREENE, 2006. p. 203-216.

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

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C. T.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by "dot ELISA" in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

- OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO L. C.; PESCATORE, A. M.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A., MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 15, supl. 2, p. 55-56, 2009.
- PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133–2139, 1996.
- 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.
- RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES JR. D. S.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 5, p. 58-62, 2009.
- RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, E.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, supl.1, p. 1115–1120, 2010.
- RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 286-308, 1991.
- SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 1, p. 382–384, 1999.
- SANOGO, Y. O.; DAVOUST, B.; INOKUMA, H.; CAMICAS, J. L.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. **Journal Veterinary Research**, v. 70, p. 205-212, 2003.
- SANTOS, F.; SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.
- SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. D. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 74-80, 2001.
- SHERDING, R. G. Riquetsiose, erliquiose, anaplasmosse e neoriqueticiose. In BIRCHARD; STEPHEN, j.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders de clínica de pequenos animais**, São Paulo: ROCA, 2008; p.184-188.
- SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti *Ehrlichia*

canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1537-1541, 1991.

SIMPSON, R. M.; GAUNT, S. D. Immunocytochemical detection of *Ehrlichia platys* antigens in canine blood platelets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 228-231, 1991.

SKOTARCZAK, B. Canine ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.10, n. 2, p. 137-141, 2003.

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

SOUSA, V. R. F.; BOMFIM, T. C. B.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 281-283, 2009.

SPARAGANO, O. A. E.; de VOS, A. P.; PAOLETTI, B.; CAMMA, C.; de SANTIS, P.; OTRANTO, D.; GIANGASPERO, A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 6, p. 527-534, 2003.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 90-93, 2001a.

SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y.; HANCOCK, S. I.; HEGARTY, B. C.; NILKUMHANG, P.; BREITSCHWERDT, E. B. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vectorborne pathogens in dogs from Thailand. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 15, p. 453-462, 2001b.

TAMÍ, I. D. C.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. **Revista Panamericana Salud Publica**, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; de MORAIS H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO R. 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**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H. RIKIHISA, Y.; Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2788–2793, 2001.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P. S.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; DE MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T.; LEYKIN, I.; SHINITSKY, M.; SHARABANI, E.; BUCH, H.; KEYSARY, A.; BARK, H.; HARRUS, S. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1, p. 145-150, 2000.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial disease of dogs. **Veterinary Clinicals of North America**, v. 21, p. 45-98, 1991.

YABSLEY, M. J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON, C. N.; CATTAN, P. F.; CHERRY, N. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B.; O'CONNOR, T.; PATERSON, R. C. T.; PEREA, M. L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J.; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2, p. 279–285, 2008.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar a ocorrência de *E. canis* e *A. platys* em cães domiciliados da cidade de Jataizinho, PR.

Objetivos Específicos:

- Identificar pela PCR a presença de *E. canis* e *A. platys* na população canina em estudo;
- Associar as variáveis estudadas (sexo, idade, acesso à rua e presença de carrapato no momento da coleta) com a ocorrência de *E. canis* e *A. platys*;
- Associar a presença de anemia e trombocitopenia com infecção por *E. canis* e *A. platys* em cães assintomáticos.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

OCORRÊNCIA DE *EHRlichia CANIS* E *ANAPLASMA PLATYS* EM CÃES DOMICILIADOS DA CIDADE DE JATAIZINHO, PARANÁ.

SILVA, Gislaine Cristina Ferreira. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães domiciliados da cidade de Jataizinho, Paraná.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina. 2011

RESUMO: Erliquiose monocítica canina, causada principalmente por *Ehrlichia canis*, e anaplasrose trombocítica canina, por *Anaplasma platys*, são importantes doenças transmitidas por carrapatos, que acometem os cães e que podem também infectar o homem. O presente estudo avaliou a ocorrência desses agentes em amostras de sangue de 256 cães domiciliados na cidade de Jataizinho, PR, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A ocorrência de *E. canis* e *A. platys* foi de 16,4% e 19,4%, respectivamente, com 5,47% de coinfeção. Não foi observada associação significativa com as variáveis sexo, idade, acesso à rua e presença de carrapatos no momento da coleta de sangue. A infecção por *E. canis* teve relação com anemia e com trombocitopenia enquanto que a infecção por *A. platys* apenas com trombocitopenia. A erliquiose e a anaplasrose canina devem estar entre os diagnósticos diferenciais quando estas alterações hematológicas forem encontradas em exames laboratoriais.

Palavras chaves: Erliquiose monocítica canina. Anaplasrose trombocítica canina. PCR. Anemia. Trombocitopenia.

SILVA, Gislaine Cristina Ferreira. **Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domiciled dogs from Jataizinho city, Parana.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina. 2011.

ABSTRACT: Canine monocytic ehrlichiosis, caused mainly by *Ehrlichia canis*, and canine thrombocytic anaplasmosis, caused by *Anaplasma platys*, are important emerging zoonotic tick-borne diseases that can affect both animals and humans. The current study evaluated the presence of *E. canis* and *A. platys* in blood samples from 256 domiciled dogs from Jataizinho city, Parana State, Brazil, using polymerase chain reaction (PCR). The occurrence of *E. canis* and *A. platys* was 16,4% and 19,4%, respectively, and 5,47% for coinfection. The presence of *E. canis* and *A. platys* was not significantly associated with the variables sex, age, access to the street and presence of ticks in the moment of blood collection. The infection with *E. canis* was related to anemia and to thrombocytopenia while the infection with *A. platys* was related only to thrombocytopenia. Canine ehrlichiosis and anaplasmosis should be among the differential diagnosis when these hematological changes are found in laboratory tests.

Key words: Canine monocytic ehrlichiosis. Canine thrombocytic anaplasmosis. PCR. Anemia and thrombocytopenia.

3.1 INTRODUÇÃO

A erliquiose e a anaplasnose canina são doenças infecciosas causadas por bactérias gram-negativas pertencentes à Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae, Gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* são organismos intracelulares obrigatórios, organizados em agrupamentos denominados mórulas, localizados comumente em leucócitos e plaquetas, respectivamente, existindo a possibilidade de infecções concomitantes (RIKIHISA, 1991; McBRIDE et al., 1996; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006). Têm grande importância na clínica de pequenos animais e em saúde pública, por se tratar de enfermidades cada vez mais prevalentes em cães, que podem também acometer o homem (DAGNONE et al., 2001; NEER; HARRUS, 2006; da COSTA; VALLE; GRECO, 2006; DOUDIER et al., 2010).

A transmissão de *E. canis* ocorre principalmente pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e acredita-se que este carrapato também seja o transmissor de *A. platys* para os cães (KORDICK et al., 1999; INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000; SUKSAWAT et al., 2001). Por este motivo, é comum a ocorrência de animais co-infectados com os dois agentes (KORDICK et al., 1999; YABSLEY et al., 2008; DAGNONE et al. 2009).

O diagnóstico da erliquiose e anaplasnose tem sido baseado na combinação de sinais clínicos e achados hematológicos. A pesquisa do hemoparasita em esfregaços de sangue é a técnica mais utilizada na rotina clínica que identifica mórulas em leucócitos e plaquetas, mas essa técnica na maioria das vezes é insuficiente, podendo ser complementado com a realização de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (NAKAGHI et al., 2008; DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2010).

Os dados existentes para erliquiose e anaplasnose na região de Londrina, norte do estado do Paraná, são de uma população hospitalar de cães (DAGNONE et al., 2003, TRAPP et al., 2006, GASPARINI et al., 2008). Portanto, o presente trabalho é o primeiro, nesta região, a avaliar a ocorrência de *E. canis* e *A. platys* em uma população de cães domiciliados, aparentemente saudáveis, associando a presença desses agentes com possíveis fatores de risco e alterações hematológicas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de Estudo e Amostras

As amostras de sangue com EDTA dos 256 cães foram coletadas nos próprios domicílios dos animais durante os meses de julho e agosto de 2010 no município de Jataizinho, estado do Paraná, Brasil. Margeada pelo Rio Tibagi e próximo ao trópico de Capricórnio, o município de Jataizinho situa-se nas coordenadas 23°15' S e 50°58' W, a 352 m de altitude. O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa – subtropical úmido com verão quente. A temperatura média anual é de 21,3°C, com ocorrência de um período mais chuvoso e quente na primavera e no verão, e um mais seco e frio no outono e no inverno (IAPAR, 2011).

3.2.2 Exames Hematológicos

Foi realizada a centrifugação do sangue em microhematócrito para obtenção do volume globular (VG) (THRALL, 2007). Também foram confeccionados esfregaços sanguíneos fixados com álcool metílico por 3 minutos, seco a temperatura ambiente e corados pela técnica de Giemsa para posterior estimativa do número de plaquetas em lâmina, conforme descrito por Silva et al. (2007).

Foram considerados anêmicos, os animais com o VG inferior a 30%, e trombocitopênicos aqueles com número de plaquetas inferior a 120.000. Apesar dos valores de referência para cães serem de no mínimo 200.000 plaquetas, com frequência ocorrem as chamadas pseudotrombocitopenias por contato prolongado com EDTA. Para minimizar esse erro, considerou-se apenas trombocitopênicos os animais com menos de 120.000 plaquetas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004).

3.2.3 Extração de DNA

As amostras de sangue foram previamente congeladas a -20°C até a realização da extração de DNA, que foi realizada com utilização do kit comercial QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi alíquotado em tubos estéreis de polipropileno de 2 mL, identificados e armazenados a -20°C, para utilização na PCR.

3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação de um segmento de 959 pares de base do gene VirB9 de *E. canis* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) EcavB9F (senso ou “forward”) e EcavB9Rev (anti-senso ou “reverse”) conforme descrito anteriormente (FELEK; HUANG; RIKIHISA, 2003). Para *A. platys*, foram utilizados os primers denominados Platys-F e Platys-R, que amplificam um segmento de 504 pares de base do gene 16S rDNA (INOKUMA et al., 2001).

Nas PCRs, foram empregados 2,5 µL de amostra de DNA. Todos os primers (Invitrogen®) foram diluídos para ter uma concentração final de 20 pmol/µL, sendo utilizado 0,5 µL em reação de volume final de 12,5 µL. O Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®) foi utilizado na concentração de 1,5 mM para as reações de *A. platys* e de 2,0 mM para *E. canis*. O tampão da PCR (10 mM Tris-Cl (ph=8,3), 50 mM KCl) (Invitrogen®) foi usado sempre na concentração 1X, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100 mM) (Invitrogen®) e 1,25 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Em toda PCR foi utilizado controle positivo da espécie alvo desejada e controles negativos da reação. As sequências térmicas usadas no termociclador (Biorad Personal Termol cycler®) foram as seguintes: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min; desnaturação final 94 °C por 1min., temperatura de anelamento de 58°C para *E. canis* e 60°C para *A. platys* por 1 min., extensão inicial 72 °C por 1 min. e extensão final de 72 °C por 7 min. totalizando 35 ciclos.

3.2.5 Detecção dos Produtos Amplificados

Todos os produtos amplificados gerados nas PCRs foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,5%, corado com syBr safe DNA stain (Invitrogen®) em cuba horizontal, com solução de TEB 1X pH 8,4 (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 6 mM EDTA) como fluido condutor de corrida. Na primeira canaleta de cada gel foi adicionado um marcador de tamanho molecular

de 100 pares de bases (Invitrogen®). O gel foi visualizado com transluminador sob a luz UV utilizando o software da Loccus biotecnologia para a obtenção das imagens.

3.2.6 Análise Estatística

A associação entre as variáveis observadas e a positividade para os agentes estudados foi determinada pelo teste do qui-quadrado. Foram analisadas as seguintes variáveis: ocorrência de *E. canis* e *A. platys* associada com o sexo dos animais (masculino e feminino), a faixa etária (0-1 ano, 2-5 anos de idade e mais de 5 anos de idade), o acesso à rua, a presença de carrapatos no momento da coleta de sangue com a presença das alterações hematológicas (anemia e trombocitopenia). Aceitou-se a probabilidade de erro de até 5% ($p < 0,05$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 256 animais avaliados, 77 (30,08%) foram positivos para pelo menos um dos agentes pesquisados, dos quais 28 (10,94%) foram positivos somente para *E. canis*, 35 (13,67%) foram positivos somente para *A. platys* e em 14 animais (5,47%) detectou-se o DNA dos dois agentes pesquisados. Portanto, a ocorrência total (apenas um agente ou coinfectados) de *E. canis* e *A. platys* foi de 16,4% e 19,14%, respectivamente.

A amplificação do gene VirB9 da *E. canis* produziu um padrão de banda específica de aproximadamente 959 pb (Figura 1), enquanto que o fragmento 16S rRNA com primers específicos para *A. platys* produziu padrão de banda única de aproximadamente 504 pb (Figura 2).

Comparando estes resultados com outros estudos realizados no Brasil que também utilizaram a PCR, verificou-se que a prevalência de *E. canis* nos cães domiciliados da cidade de Jataizinho (16,4%) foi inferior à encontrada na cidade de Londrina, PR (DAGNONE et al., 2003 – 22%), Jaboticabal, SP (DAGNONE et al., 2009 - 88%; NAKAGHI et al., 2008 - 53,3%; FARIA et al., 2010 - 72,5%), Botucatu, SP (BULLA et al., 2004 - 30,9%; DINIZ et al., 2007 - 77,7%; UENO et al., 2009 - 40%), Ribeirão Preto, SP (SANTOS et al., 2009 - 38,9%), Recife, PE (RAMOS et al., 2010 - 57%) e Salvador, BA (SOUZA et al., 2010 - 35,6%), mas superior à encontrada em outro estudo realizado no estado da Bahia

(CARVALHO et al., 2008 - 7,8%). É necessário enfatizar que a maioria desses estudos foi realizada com cães atendidos em hospitais veterinários, ou seja, que já apresentavam sinais clínicos e/ou alterações hematológicas compatíveis com a infecção pelo agente pesquisado.

Para *A. platys*, a ocorrência verificada (19,4%) foi inferior à encontrada no Recife, PE (RAMOS et al., 2009 – 55%) e superior a do Rio de Janeiro, RJ (FERREIRA et al., 2007 – 15,84%) e de Ribeirão Preto, SP (SANTOS et al., 2009 – 14,9%). Em outros países a prevalência variou de 4 a 55% (KORDICK et al., 1999; HUANG et al., 2005; De LA FUENTE et al., 2006; YABSLEY et al., 2008).

As variações encontradas nos percentuais de positividade estão relacionadas principalmente à população canina estudada, à exposição dessas populações ao carrapato vetor e ao método diagnóstico empregado (SOLANO-GALLEGO et al., 2006).

A ocorrência de cães co-infectados com as espécies *A. platys* e *E. canis* (5,47%) reforça a hipótese de que elas são transmitidas pelo mesmo vetor, fato verificado, também, em diferentes regiões do Brasil (DANTAS-TORRES., 2008; RAMOS et al., 2009; SANTOS et al., 2009) e do mundo (SUKSAWAT et al., 2001ab; HUANG et al., 2005; YABSLEY et al., 2008).

Não foi observada associação significativa entre infecção por *E. canis* e as variáveis estudadas (sexo, idade, acesso à rua e presença de carrapatos no momento da coleta de sangue) (Tabela 1).

Para *E. canis*, também não foi encontrada diferença significativa com relação a idade e sexo em Cuiabá, MT (SOUSA et al., 2010) e em Ilhéus e Itabuna, BA (CARVALHO et al., 2008), utilizando métodos moleculares, e em Cuiabá, MT (SILVA et al., 2010), Monte Negro, RO (AGUIAR et al., 2007), Patos, PB (AZEVEDO et al., 2011), Rio Grande do Sul (SAITO et al., 2008), Estados Unidos (RODGERS, MORTON; BALDWIN, 1989), Israel (HARRUS et al., 1997) e Japão (INOKUMA, OHNO, YAMAMOTO, 1999), utilizando métodos sorológicos.

Outros autores relatam maior prevalência de *E. canis* em cães adultos e idosos, associação atribuída ao maior tempo de exposição ao vetor (WATANABE et al., 2004; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005; TRAPP et al., 2006; COSTA JR et al., 2007).

Ao contrário do presente estudo, Azevedo et al. (2011), estudando cães do semi-árido da Paraíba, observaram que animais com algum acesso à rua

podem estar mais expostos ao risco de infecção por *E. canis* em decorrência de maior chance de contato com carrapatos infectados.

Moreira et al. (2003) encontraram correlação positiva entre a ocorrência de *E. canis* e a exposição ao vetor. A falta de diferença significativa no presente estudo se deve, provavelmente, ao fato de que as amostras de sangue foram coletadas no inverno. As condições climáticas podem representar um fator importante influenciando a dinâmica das populações de carrapatos. Um estudo realizado em Minas Gerais observou que cães que vivem em cidade com temperatura ideal para o desenvolvimento do carrapato possuem 4,6 vezes maior risco de serem soropositivos para *E. canis*, quando comparados com outros que vivem em regiões onde a temperatura média anual é menor (COSTA JR et al., 2007). Como, até o momento, a única forma de transmissão natural conhecida é através do carrapato, é certo que os cães positivos já tivessem tido contato com o vetor em algum momento de sua vida mesmo estando ele ausente na ocasião da coleta de sangue.

Assim como para *E. canis*, também não foi observada associação significativa entre infecção por *A. platys* e as variáveis estudadas (sexo, idade, acesso à rua e presença de carrapatos no momento da coleta de sangue) (Tabela 2).

Diferentemente dos estudos com *E. canis*, pouco se sabe sobre fatores de risco associados com *A. platys* no Brasil (DANTAS-TORRES, 2008).

Em um estudo realizado em Minas Gerais por Costa Jr. et al., (2007) ao avaliar a influência do sexo, idade e presença de carrapatos em animais positivos para *A. platys*, apenas observaram associação positiva do agente com a presença do vetor..

Uma das alterações hematológicas comumente encontrada em animais com EMC é a anemia, que geralmente é normocítica normocrômica sugerindo resposta medular não regenerativa ou pouco responsiva (HARRUS et al., 1997; MOREIRA et al., 2003; BULLA et al., 2004; BORIN; CRIVELANTI; FERREIRA, 2009; GAUNT et al., 2010). A atuação do sistema monocítico-fagocitário, lise celular pela ação do sistema complemento e supressão da eritropoiese na medula óssea são os mecanismos apontados como responsáveis pelo quadro anêmico da doença (MOREIRA et al., 2003).

Entre os cães positivos para *E. canis*, 28,57% estavam anêmicos enquanto que cães negativos, apenas 13,94% (Tabela 3), pode-se observar, portanto, que a proporção de anêmicos é significativamente maior nos cães infectados com *E. canis*, comprovando que a erliquiose é uma importante causa de anemia. Esses dados estão de acordo com Dagnone et al. (2003) e Santarém (2003) que afirmaram ser a anemia um achado importante em populações hospitalares de cães.

De maneira diferente, Costa Jr et al. (2007), em Minas Gerais, Sousa et al. (2010), no Mato Grosso e Ueno et al. (2009), em Botucatu, SP não verificaram associação positiva para anemia frente a infecção por *E. canis*. Essas variações no eritrograma ocorrem dependendo da fase da doença (HARRUS et al., 1997; BULLA et al. 2004).

Outra alteração hematológica encontrada e comum nas infecções por esse agente é a trombocitopenia. Entre os cães positivos para *E. canis*, 59,52% estavam trombocitopênicos, enquanto que os cães negativos apenas 36,58%. Pode-se observar, portanto, que a proporção de trombocitopênicos foi significativamente maior nos cães infectados com *E. canis*, comprovando que a erliquiose é uma importante causa de trombocitopenia (Tabela 3).

Da mesma forma, Santos et al. (2009) observaram que a prevalência de *E. canis* foi maior em cães trombocitopênicos do que em não-trombocitopênicos e que a proporção de trombocitopênicos foi maior entre os cães infectados do que entre os não infectados. Santarém (2003) concluiu que a trombocitopenia é um importante indicativo de erliquiose em casos agudos da doença. Estudando a prevalência de *E. canis* em cães trombocitopênicos, Bulla et al. (2004), em Botucatu, e Macieira et al. (2005), no Rio de Janeiro, também observaram relação entre a trombocitopenia e a erliquiose.

Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a trombocitopenia associada à infecção por *E. canis*, entre eles, o aumento do consumo de plaquetas, o sequestro esplênico, a destruição por mecanismos imunomediados, bem como a ocorrência de disfunções plaquetárias associadas à doença (HARVEY, 2006; GAUNT et al., 2010).

No entanto, de acordo com Dagnone et al. (2003), a erliquiose não é a principal causa da trombocitopenia na região estudada. Estudando uma população hospitalar em Londrina, os autores relataram a prevalência de 20% de *E. canis* em

animais trombocitopênicos, sem comparar, no entanto, com a prevalência em cães sem trombocitopenia.

No presente estudo não foi observada relação entre a positividade para *A. platys* e a anemia (Tabela 4). Gaunt et al. (2010), em estudo experimental, também não encontraram relação significativa entre infecção por *A. platys* e a queda do Volume Globular.

Entre os cães positivos para esse agente, 61,70% estavam trombocitopênicos; enquanto que os cães negativos, 35,5%. Pode se observar, portanto, que a proporção de trombocitopenia é maior nos cães infectados por *A. platys*, comprovando que a anaplasmosose é uma importante causa desta alteração hematológica.

Gaunt et al. (2010), em estudo experimental, também observaram alta relação entre anaplasmosose e trombocitopenia. Santos et al. (2009) chamaram a atenção para o fato de que, apesar de a trombocitopenia ser geralmente associada com a infecção por *E. canis*, a infecção por *A. platys* também pode ser responsável por essa alteração.

Diferentes tipos de estudos são realizados para relacionar a prevalência de hemoparasitas com alterações hematológicas. Um deles consiste em diagnosticar o agente em cães com anemia e/ou trombocitopenia. Pode-se, também, comparar a prevalência do agente em animais com e sem alterações; neste caso, se a prevalência for maior entre aqueles com a alteração, é necessário não considerar isto como fator de risco e sim como uma consequência da infecção.

Avaliando por outro ângulo, é possível, ainda, analisar apenas cães positivos para um agente, comparando, dentre eles, a porcentagem de anêmicos e/ou trombocitopênicos com a de cães que possuem valores de VG e/ou plaquetas dentro dos valores de referências. Se a porcentagem dos anêmicos e/ou trombocitopênicos for maior, conclui-se, equivocadamente, que o agente é o seu causador. No entanto, é importante analisar, também, a proporção de cães que apresentam essas alterações entre os negativos. Se esta proporção for igual entre os positivos e negativos, significa que a presença do agente não tem influência sobre a alteração. Ou seja, para concluir se o agente é causador de anemia e/ou trombocitopenia, é necessário avaliar a proporção dessas alterações em animais positivos e negativos.

No presente trabalho, se for analisada apenas a porcentagem de cães anêmicos dentre os positivos para *E. canis*, que foi de 28,57%, pode parecer que o agente não é uma importante causa, já que mais de 70% dos casos de anemia tivessem outra origem. No entanto, entre os cães negativos a proporção de anêmicos é ainda menor - 13,94%, o que permitiu concluir que a erliquiose é sim responsável por essa alteração.

3.4 CONCLUSÃO

Ehrlichia canis e *A. platys* são patógenos comuns em cães domiciliados da cidade de Jataizinho, PR.

A PCR é um método adequado para detectar a infecção por *E. canis* e *A. platys* em cães.

Sexo, idade, acesso à rua e presença de carrapatos no momento da coleta de sangue não tiveram associação com a infecção por *E. canis* e/ou *A. platys*.

A infecção por *E. canis* é importante causa de anemia e de trombocitopenia enquanto que a infecção por *A. platys* causa apenas trombocitopenia.

A erliquiose e a anaplasmosose canina devem estar entre os diagnósticos diferenciais quando estas alterações hematológicas forem encontradas em exames laboratoriais.

Figura 1 – Fotomicrografia de eletroforese com gel de agarose de produtos da PCR com primers específicos para *Ehrlichia canis*, com algumas amostras de sangue de cães de Jacarezinho, PR. (100pb = marcador de peso molecular, c += controle positivo, c- = controles negativos; canaletas 1 a 6 - amostras testadas).

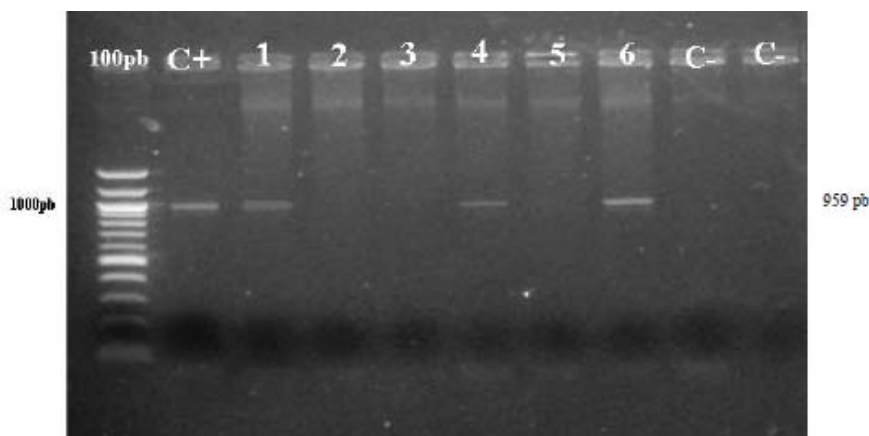


Figura 2 – Fotomicrografia de eletroforese com gel de agarose de produtos da PCR com primers específicos para *Anaplasma platys*, com algumas amostras de sangue de cães de Jacarezinho, PR. (100pb = marcador de peso molecular, c += controle positivo, c- = controles negativos; canaletas 1 a 6 - amostras testadas).

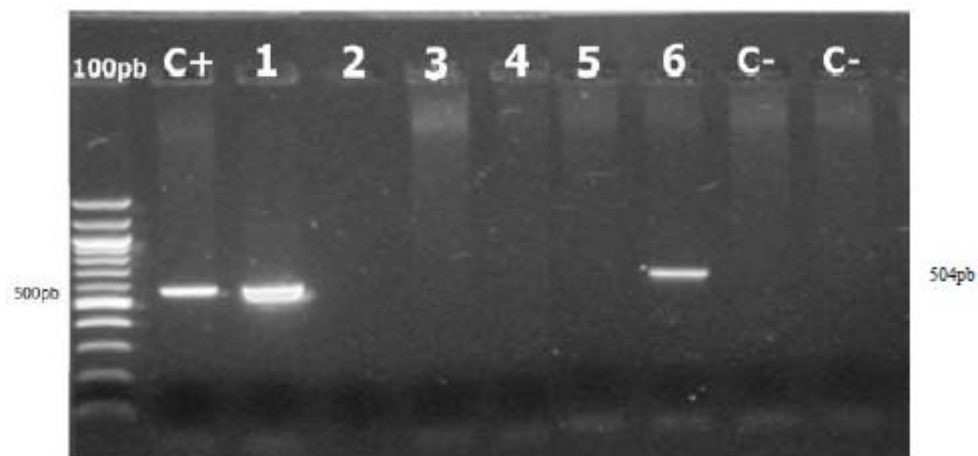


Tabela 1 – Análise da associação entre *Ehrlichia canis* e possíveis fatores de risco em cães domiciliados de Jataizinho – PR.

VARIÁVEL	n	PCR(+)	%	X ²	p
SEXO					
MACHO	142	26	18,3	0,472	0,4921
FÊMEA	112	16	14,28		
não determinado	2	0			
IDADE					
< 1 ano	43	6	13,95	0,6291	0,8897
1 a 5 anos	148	24	16,22		
> 5 anos	57	11	19,29		
não determinado	8	1	12,5		
ACESSO A RUA					
SIM	143	22	15,38	0,1067	0,744
NÃO	113	20	17,70		
CARRAPATO					
SIM	29	5	17,24	0,01885	0,8908
NÃO	227	37	16,3		

n = número de animais; % prevalência

Tabela 2 – Análise da associação entre *Anaplasma platys* e possíveis fatores de risco em cães domiciliados de Jataizinho – PR.

VARIÁVEL	n	PCR(+)	%	X ²	p
SEXO					
MACHO	142	28	19,72	0,001159	0,9728
FÊMEA	112	21	18,75		
não determinado	2	0			
IDADE					
< 1 ano	43	8	18,6	1,828	0,6088
1 a 5 anos	148	27	18,24		
> 5 anos	57	11	19,3		
não determinado	8	3	37,5		
ACESSO A RUA					
SIM	143	32	22,38	0,09337	0,1867
NÃO	113	17	15,04		
CARRAPATO					
SIM	29	8	27,58	0,1643	0,3285
NÃO	227	41	18,06		

Tabela 3 – Proporção de anemia e trombocitopenia entre as amostras positivas e negativas para *Ehrlichia canis*, nos cães domiciliados de Jataizinho, PR.

<i>Ehrlichia canis</i>				
Anemia	PCR + (n=42)	PCR – (n=208)	X ²	P
sim	28,57% (12/42)	13,94% (29/208)	4,44	0.0311
não	71,43% (30/42)	86,06% (179/208)		
Trombocitopenia	PCR+ (n=42)	PCR- (n=205)		
sim	59,52% (25/42)	36,58% (75/205)	6,69	0.009696
não	40,47% (17/42)	63,41% (130/205)		

Tabela 4 – Proporção de anemia e trombocitopenia dentre os positivos e os negativos para *Anaplasma platys* nos cães domiciliados de Jataizinho – PR.

<i>Anaplasma platys</i>				
Anemia	PCR+ (n=49)	PCR- (n=201)	X ²	p
sim	20,41% (10/49)	15,42% (31/201)	0.3968	0.5287
não	79,59% (39/49)	84,57% (170/201)		
Trombocitopenia	PCR+ (n=47)	PCR- (n=200)		
sim	61,70%(29/47)	35,5% (71/200)	9.784	0.001761
não	38,29% (18/47)	64,5% (129/200)		

3.5 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: *Ixodidae*) Ticks from Brazil. **Vector-borne Diseases**, v. 44, n.1, p. 126-132, 2007.
- AZEVEDO, S. S.; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F.; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. F.; UCHÔA, I. C. P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.
- BORIN, S.; CRIVELIN, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO, J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146. 2004.
- CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.
- COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinical Small Animal**, 33, n.4, p. 863–884. 2003.
- COSTA Jr, L. M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M. F. B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 673–676, 2007.
- DA COSTA, P. S. G.; VALLE, L. M.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. More about Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 7-10, 2006.
- DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.
- DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2008.

De LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; NICOSIA, S.; ALONGI, A.; LA MANTIA, F.; KOCAN, K. M. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. **BMC Veterinary Research**, v. 24, n. 2, p. 1186-1746, 2006.

DINIZ, P. P. V. P.; SCHWARTZ, D. S.; MORAIS, H. S. A.; BREITSCHWERDT, E. B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 689- 697, 2007.

DOUDIER, B.; OLANO, J.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 149–154, 2010.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BECKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Pseudotrombocitopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 321-324, 2004.

FARIA, J. L. M.; DAGNONE, A. S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FELEK, S.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Sequence and expression analysis of *virB9* of the type iv secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 6063–6067, 2003

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M.; GUIMARÃES, C. M., de SÁ, A. G.; ABREU, F. S.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 113-119, 2007.

GASPARINI, M. R.; COELHO, A. L. M.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C. Ocorrência de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de uma população hospitalar em Londrina, Paraná. In: Program & Resumos do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul, 2008, Curitiba. **XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Curitiba, 2008. v. 15.

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. P. V. P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, p. 247-50, 1997.

HARVEY, J. W. Trombocytotropic anaplasmosis (*A. platys* (*E. platys*) infection). In GREENE, C. E. **Infections diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: GREENE, 2006. p. 203-216.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M. J.; ORELLANA, N. G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 211-216, 2005.

INOKUMA, H.; OHNO, K.; YAMAMOTO, S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi prefecture, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 6, n. 10, p. 1153–1155, 1999.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 4219-4222, 2000.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR). Disponível em <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=860>. Acesso em 19 de jun. de 2011.

KORDICK, S. K.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK, K. L.; COLITZ, C. M.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY, J. M.; RUMBOUGH, R.; MCPHERSON, J. T.; MACCORMACK, J. N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2631–2638, 1999.

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

McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441–447, 1996.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2003; v. 55, n.2, p. 141-147, 2003.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In

GREENE, C. E. **Infections diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: GREENE, 2006. p. 203-216.

RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES JR. D. S.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A.

G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 58-62, 2009.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, E.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1115–1120, 2010.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 286-308, 1991

RODGERS, S. J.; MORTON, R. J., BALDWIN, C. A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, n. 2, p. 154-159, 1989.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 75-79, 2005.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para o diagnóstico de *Ehrlichia canis***, 2003, Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SANTOS, F.; SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti *Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

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

SOUSA, V. R.F.; ALMEIDA, A. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S. DALCIN, L. BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v.40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

SOUZA, B. M. P. S.; SOUZA, B. M.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C.; UZÊDA, R.S.; DE ALCÂNTARA, A. C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 90–93, 2001a.

SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y.; HANCOCK, S. I.; HEGARTY, B. C.; NILKUMHANG, P.; BREITSCHWERDT E. B. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vectorborne pathogens in dogs from Thailand. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 5, p. 453–462, 2001b.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; de MORAIS H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3, p. 223-230, 2006.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO R. 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**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

WATANABE, M.; OKUDA, M.; TSUJI, M.; INOKUMA, H. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 101-107, 2004.

YABSLEY, M. J.; McKIBBEN, J.; MACPHERSON, C. N.; CATTAN, P. F.; CHERRY, N. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. O'CONNOR, T.; PATERSON, R. C. T.; PEREA, M. L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2, p. 279–285, 2008.