

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ANDERSON BARROS TEIXEIRA PINTO

ANAPLASMATACEAE EM FELINOS (*Felis catus*) NO MUNICÍPIO DE CAMPOS
DOS GOYTACAZES (RJ): DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2016

ANDERSON BARROS TEIXEIRA PINTO

ANAPLASMATACEAE EM FELINOS (*Felis catus*) NO MUNICÍPIO DE CAMPOS
DOS GOYTACAZES (RJ): DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Orientador Professor Antonio Peixoto Albernaz

Campos dos Goytacazes

2016

ANDERSON BARROS TEIXEIRA PINTO

ANAPLASMATACEAE EM FELINOS (*Felis catus*) NO MUNICÍPIO DE CAMPOS
DOS GOYTACAZES (RJ): DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 24 de maio de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Leonardo Serafim da Silveira (D.Sc., Produção Animal) - UENF

Prof^a Adriana Jardim de Almeida (D.Sc., Ciência Animal) - UENF

Prof. Shaytner Campos Duarte (D.Sc., Ciência Animal) – FMC

Prof. Clóvis de Paula Santos (D.Sc., Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária) - UENF

Prof. Antônio Peixoto Albernaz (D.Sc., Produção Animal) - UENF

(Orientador)

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

138/2016

Pinto, Anderson Barros Teixeira

Anaplasmatáceas em felinos (*Felis catus*) no município de Campos dos Goytacazes (RJ) : diagnóstico e caracterização / Anderson Barros Teixeira Pinto. – Campos dos Goytacazes, 2016.

113 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Antonio Peixoto Albernaz.

Área de concentração: Sanidade animal.

Bibliografia: f. 101-111.

1. ANAPLASMATACEAE 2. ERLIQUIOSE 3. ANAPLASMOSE 4. FELINOS 5. ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS 6. PCR 7. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal II. Título

CCT 636.8089

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus amados pais Anilton Teixeira Pinto e Ana de Cássia Barros Teixeira Pinto, que me ensinaram, e me ensinam, a caminhar com minhas próprias pernas, sempre com amor, confiança e muito trabalho;

Dedico também essa tese aos meus irmãos Anilton Barros Teixeira Pinto e Mônica Barros Teixeira Pinto e aos meus sobrinhos Karina, Igor, Rafael e Gustavo;

Dedico à minha companheira de caminhada Mariana Palha de Brito Jardim que sempre me apoiou em minhas decisões, dando-me carinho, compreensão e amor.

Aos meus incontáveis animais que sempre estiveram comigo em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me auxiliou na compreensão do conhecimento necessário para realizar as pesquisas, a escrita e acima de tudo me permitiu reduzir para demonstrar meus limites quando eram necessários para a minha caminhada;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelo aprendizado teórico e prático para a formação em doutor;

Ao meu orientador Antonio Peixoto Albernaz, professor de Clínica Médica de Pequenos Animais pela UENF, pelos 13 anos de convívio, pela amizade e confiança nos meus trabalhos e experimentos realizados no setor de Patologia Clínica. Obrigado por todos os ensinamentos necessários para a minha formação, pelas instruções de vida e pelos exemplos profissionais!

Agradeço à professora Giane Regina Paludo, professora das disciplinas de Fisiologia Veterinária e Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UnB, pelo carinho na minha recepção em Brasília, por ter cedido tempo e espaço para a pesquisa em seu laboratório e ter me confiado os conhecimentos necessários para a realização dos protocolos laboratoriais do experimento, assim como o fornecimento de materiais para processamento;

Para estes conhecimentos obtidos com a professora Giane, o auxílio da médica veterinária e técnica do setor Marcela Corrêa Scalon do laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular foi de extrema importância para o exercício da pesquisa, sendo responsável por meu treinamento prático e teórico para realização dos procedimentos;

Agradeço ao professor Gilberto Salles Gazêta, chefe do laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses, que forneceu o espaço e tempo para realização da minha pesquisa neste setor para elaboração das técnicas sorológicas para o meu experimento. Da mesma forma agradeço a Arannadia Barbosa Silva, doutoranda do setor, que me auxiliou em todos os procedimentos necessários;

Agradeço a equipe de trabalho para a realização das coletas e auxílio na realização dos experimentos, composta pelas bolsistas de iniciação científica Mariana Palha de Brito Jardim e Natasha Nogueira Ferreira, que correram comigo “para cima

e para baixo” por vários locais da cidade para realização dos atendimentos e coletas. A pesquisa também pertence a esta maravilhosa equipe a que me reporto amiga e talentosa. Esta tese é dedicada a Mariana, por toda dedicação, esforço ao aprendizado e evolução como profissional. Dedico a Natasha esta tese, amiga dedicada e talentosa, que esta pesquisa tenha sido uma pequena parcela para seu crescimento profissional;

Agradeço de coração aos que fizeram e fazem parte da minha vida Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Cláudio Baptista de Carvalho, Leonardo Serafim da Silveira e Adriana Jardim de Almeida, professores que sempre me forneciam palavras de apoio e exemplos profissionais;

Ao técnico do Laboratório Orlando Augusto Melo Júnior que me forneceu apoio na pesquisa, mas acima de tudo, todo conhecimento que adquiri no setor de Patologia Clínica, o que me configura no profissional atualmente, além de sua amizade. Agradeço ao técnico de enfermagem Evaldo por ter me auxiliado em algumas coletas para o meu experimento;

Agradeço aos proprietários pela colaboração e por ter cedido os animais para as coletas e realizações dos procedimentos laboratoriais. Principalmente a Dona Sônia que me forneceu vários felinos de seu recinto;

Além de todos que me auxiliaram na tese diretamente, existem aqueles que de alguma forma me ajudaram na tese com palavras de apoio e base para a sua conclusão. Em especial Saulo Tinoco de Lannes, Bethania do Amaral Falcão, Jonhny Maia Junior e Ana Carolina Queiroz Lima;

Agradeço aos meus amigos e companheiros de trabalho da FIPERJ que me auxiliaram com apoio, palavras amigas e cumplicidade para a conclusão do meu trabalho. Agradeço aos amigos Oswaldo, Maíra, Shaytner e Carlos Eduardo;

Para o meu aprendizado prático em aulas, eu agradeço aos alunos pelo amadurecimento, aprendizado e até mesmo sabedoria para a minha formação; Dificuldades e confiança me permitiram o ensino para estes do conteúdo em algumas aulas do curso de Medicina Veterinária.

EPÍGRAFE

“Ser como o rio que deflui silencioso dentro da noite.

Não temer as trevas da noite.

Se há estrelas no céu, refleti-las

E se os céus se pejam de nuvens,

Como o rio as nuvens são água,

Refleti-las também sem mágoa

Nas profundidades tranquilas”

Manuel Bandeira

“De que vale a um homem ganhar o mundo inteiro e perder sua alma? ”

(Marcos 8, 36)

RESUMO

Pinto, Anderson Barros Teixeira: Anaplasmatáceas em gatos (*Felis catus*) no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Orientador: Antonio Peixoto Albernaz.

O Brasil ocupa o segundo lugar em população de pequenos animais no mundo. A população de gatos no Brasil em 2013 foi de aproximadamente 22 milhões. A tendência é que este número continue crescendo, já que o gato é o animal doméstico que mais se ajusta ao estilo de vida do homem atual. Os objetivos do presente trabalho foram a caracterização dos agentes da família Anaplasmatáceas que acometem os felinos domésticos e esclarecer a importância dos felinos na cadeia epidemiológica das doenças riquetsiais. Foram obtidas 60 amostras sanguíneas de felinos domésticos, independentes de sanidade, provenientes de atendimentos clínicos. Destas amostras foram realizados exames de hemograma e bioquímica sérica, e os dados foram utilizados para preenchimento da ficha laboratorial. As amostras foram processadas para obtenção de concentração de células e soro, para realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e reação por imunofluorescência indireta (RIFI), respectivamente, para identificação de agentes da família Anaplasmatáceas. Os dados foram utilizados para análise descritiva para formação de frequências epidemiológicas e para realização de testes não-paramétricos pelo Qui-quadrado de Pearson ($p \leq 5\%$) associando as alterações laboratoriais às infecções por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum*. Os resultados obtidos revelaram a presença de 33,33% de agentes Anaplamastáceas na amostra populacional, sendo 8,33% para *E. canis*, 20% para *A. platys* e 10% para *A. phagocytophilum*. Foram realizadas as sorologias das amostras, pela imunofluorescência indireta, para verificação de amostras reagentes para *A. phagocytophilum*, sendo 8,33% amostras reagentes na amostra populacional. As alterações clínicas e laboratoriais mais frequentes em pacientes positivos por agentes Anaplasmatáceas foram letargia, linfadenomegalia, mucosas pálidas, desidratação, trombocitopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Destes dados foram realizadas as correlações não paramétricas e não foram verificadas dependências das alterações laboratoriais com a presença de animais positivos para agentes

Anaplasmatidae. A identificação dos agentes *E. canis* e *A. platys* visa esclarecer a doença na região, sendo instrumento de orientação da doença pelo médico veterinário ao proprietário para que tenha medidas adequadas de tratamento e prevenção. A presença de agentes *A. phagocytophilum* é considerada, sem dúvidas, uma notificação importante devido ao potencial zoonótico. Tal risco tem que ser estudado intensamente devido aos fatores biológicos existentes como vetores responsáveis pela transmissão, capacidade de inoculação e capacidade de infecção.

Palavras-chave: Anaplasmatidae, erliquiose, anaplasmoses, felinos, alterações clínicas e laboratoriais, PCR, Imunofluorescência Indireta.

ABSTRACT

Pinto, Anderson Barros Teixeira: Anaplasmatataceae in cats (*Felis catus*) in the city of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Supervisor: Antonio Peixoto Albernaz

The Brazil ranks second in population of small animals in the world. The population of cats in Brazil in 2013 was approximately 22 million. The trend is that this number will continue to grow as the cat is the pet that best fits the lifestyle of the modern man. The objectives of this study were to characterize the agents belonging to Anaplasmatataceae family that affect domestic cats and clarify the importance of cats in the epidemiology of rickettsial diseases. 60 blood samples were obtained from domestic cats, sanity independent from clinical care. From these samples, blood count and Serum biochemical tests were performed, and the data were used to fill the laboratory form. The samples were processed to obtain cell concentration and serum for performing the polymerase chain reaction (PCR) and indirect immunofluorescence assay (IFA), respectively, for identifying agents belonging to Anaplasmatataceae family. The data was used for descriptive analysis for the formation of frequencies and to perform non-parametric tests using the chi-square test ($p \leq 5\%$) associating the laboratory findings to infection by *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys*. The results revealed the presence of 33.33% for agents belonging to Anaplasmatataceae family in the population sample, and 8.33% for *E. canis*, 20% for *A. platys* and 10% for *A. phagocytophilum*. Serology samples were performed by indirect immunofluorescence to check reagents samples to *A. phagocytophilum*, and 8.33% samples reagents in the sample population. The most frequent clinical and laboratory findings in patients positive for Anaplasmatataceae agents were lethargy, enlargement of lymph nodes, pale mucous membranes, dehydration, thrombocytopenia, hyperglobulinemia and hypoalbuminemia. These data were performed nonparametric correlations and it was observed that laboratory changes and the presence of positive animals were not dependent. Identification of *E. canis* and *A. platys* agents aims to clarify the disease in the region, such as disease education tool that takes the appropriate measures of treatment and prevention. The presence of *A. phagocytophilum* agents is considered, without doubt, an important notice due to the

zoonotic potential. This risk has to be studied intensely due to the existing biological factors as vectors responsible for the transmission, inoculation capacity and ability to infection.

Keywords: Anaplasmatataceae, ehrlichiosis, anaplasmosis, cats, clinical and laboratory findings, PCR, Immunofluorescence Indirect Assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Árvore filogenética da família Anaplasmataceae com base em sequências associadas aos genes *rrs*, *gltA* e *groEL* (3504-3566bp), utilizando o método de Neighbor-Joining. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de Parolla e Raoult (2007)24
- Figura 2: Kit de Reação por Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Anaplasma phagocytophilum* / Anticorpos IgG conjugado felino da marca Fuller Laboratories® utilizado na identificação de amostras de felinos reagentes: A) Controle positivo; B) Controle negativo; C) Conjugado; D) Lâmina impregnada com substrato. Fonte: Arquivo pessoal.....46
- Figura 3: A) Utilização dos diluentes de lise, lavagem, secagem e de eluição para putificação do DNA da amostra sanguínea; B) Durante os procedimentos a centrifuga foi utilizada para eliminação das impurezas e com a eluição gerar o produto final, o DNA. Fonte: Arquivo pessoal.....49
- Figura 4: A) Inserindo as soluções dos produtos amplificados devidamente corados em cada poço do gel de agarose; B) Posicionamento do gel sobre a lâmpada Ultravioleta para a realização dos registros dos resultados. Fonte: Arquivo pessoal.....55
- Figura 5: Proporção de corpúsculos de inclusão dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....61
- Figura 6: A- Corpúsculo de inclusão encontrado em neutrófilo segmentado (seta) durante a pesquisa de hemoparasitas pela microscopia óptica em objetiva de aumento 100X; B- Corpúsculo de inclusão encontrado em plaqueta (seta) durante a pesquisa de hemoparasitas pela microscopia óptica em objetiva de aumento 100X. Fonte: Arquivo pessoal.....62
- Figura 7: Proporção de corpúsculos de inclusão em cada célula dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....63
- Figura 8: Proporção de amostras positivas na PCR para agentes da família Anaplasmataceae dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....64
- Figura 9: Proporção de amostras positivas para o agente *Ehrlichia canis* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....66
- Figura 10: Proporção de amostras positivas para o agente *Anaplasma platys* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....67
- Figura 11: Proporção de amostras positivas para o agente *Anaplasma phagocytophilum* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....68
- Figura 12: Proporção de amostras positivas na PCR que apresentaram corpúsculos de inclusão na hematoscopia.....69

Figura 13: Proporção de amostras positivas na PCR para <i>A. phagocytophilum</i> que apresentaram corpúsculos de inclusão em neutrófilos na hematoscopia.....	71
Figura 14: Proporção de amostras positivas na PCR para <i>A. platys</i> que apresentaram corpúsculos de inclusão em plaquetas na hematoscopia.....	73
Figura 15: Proporção de amostras reagentes para o agente <i>Anaplasma phagocytophilum</i> dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	77
Figura 16: Proporção de amostras reagentes na RIFI para <i>A. phagocytophilum</i> que apresentaram corpúsculos de inclusão hematoscopia.....	78
Figura 17: Proporção de amostras reagentes na RIFI para <i>A. phagocytophilum</i> que apresentaram amostras positivas na PCR para <i>A. phagocytophilum</i>	80
Figura 18: Proporção de amostras reagentes na RIFI para <i>A. phagocytophilum</i> que apresentaram amostras positivas na PCR para <i>E. canis</i>	81
Figura 19: Taxas de coinfeção entre agentes Anaplasmataceae na amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.....	83
Figura 20: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para agentes da família Anaplasmataceae (n=20) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	85
Figura 21: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para <i>Ehrlichia canis</i> (n=5) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	87
Figura 22: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para <i>Anaplasma platys</i> (n=12) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	88
Figura 23: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (n=6) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	89
Figura 24: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para agentes da família Anaplasmataceae (n=20) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	91
Figura 25: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para <i>Ehrlichia canis</i> (n=5) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	92
Figura 26: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para <i>Anaplasma platys</i> (n=12) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	94
Figura 27: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (n=6) em Campos dos Goytacazes, RJ.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das mudanças taxonômicas entre os gêneros <i>Ehrlichia</i> e <i>Anaplasma</i> , segundo Rymaszewska e Grenda (2008). Letras A, B, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 e C, indicam uma mudança na posição sistemática.....	23
Tabela 2: Espécies pertencentes ao gênero <i>Ehrlichia</i> e suas especificidades e interações biológicas segundo Parola e Raoult, 2007.....	28
Tabela 3: Espécies pertencentes ao gênero <i>Anaplasma</i> e suas especificidades e interações biológicas segundo Parola e Raoult, 2007.....	31
Tabela 4: Números de animais relacionados entre as variáveis graus dos parâmetros para os níveis de globulina (y_i) e grupos de animais, e os cálculos de qui-quadrado.....	96
Tabela 5: Números de animais relacionados entre as variáveis graus dos parâmetros para os níveis de albumina (y_i) e grupos de animais, e os cálculos de qui-quadrado.....	97
Tabela 6: Números de animais relacionados entre as variáveis graus dos parâmetros para os níveis de plaquetas (y_i) e grupos de animais, e os cálculos de qui-quadrado.....	98

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO -----	17
2- OBJETIVOS -----	20
2.1- OBJETIVO GERAL-----	20
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	20
2.2.1- Quanto aos aspectos Imunomoleculares -----	20
2.2.2- Quanto aos aspectos Epidemiológicos -----	20
2.2.3- Quanto aos aspectos clínico-laboratoriais -----	21
3- REVISÃO DE LITERATURA -----	22
3.1- RELAÇÃO TAXONÔMICA ENTRE AS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE-----	22
3.2- GÊNERO <i>Ehrlichia</i> -----	25
3.2.1- Morfologia -----	26
3.2.2- Interação Parasita-Hospedeiro das espécies do gênero <i>Ehrlichia</i> -----	27
3.3- GÊNERO <i>Anaplasma</i> -----	28
3.3.1- Morfologia -----	29
3.3.2- Interação Parasita-Hospedeiro das espécies do gênero <i>Anaplasma</i> -----	30
3.4- ERLIQUIOSE E ANAPLASMOSE NA ESPÉCIE FELINA-----	31
3.5- ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA-----	33
3.6- PATOGENIA-----	34
3.7- DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL-----	34
3.7.1- Sinais, sintomas clínicos e alterações laboratoriais -----	35
3.7.2- Diagnóstico laboratorial -----	35
3.7.2.1- Avaliação direta dos esfregaços sanguíneos ou imprints-----	35
3.7.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) -----	36
3.7.2.3- Sorologia-----	37
3.8- TRATAMENTO DAS DOENÇAS RIQUETSIAIS-----	39
3.9- POTENCIAL ZONÓTICO-----	39
4- MATERIAL E MÉTODOS -----	41
4.1- AMOSTRAGEM-----	41
4.2- REQUISITOS DE INCLUSÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS NA FICHA CLÍNICA -----	41
4.3- LOCAIS DE REALIZAÇÃO DAS PESQUISAS-----	42
4.4- COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL-----	43
4.4.1- Aquisição das amostras sanguíneas -----	43
4.4.2- Avaliação de hemoparasitas em microscopia óptica -----	43
4.4.3- Realização de hemograma e testes bioquímicos -----	44

4.5- REAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)-----	45
4.5.1- Realização dos ensaios imunológicos -----	45
4.6- EXTRAÇÃO DO DNA-----	48
4.6.1- Sangue total -----	48
4.7- REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)-----	51
4.7.1- PCR do GAPDH: Avaliação da qualidade da extração do DNA -----	52
4.7.2- PCR dos agentes da família Anaplasmataceae -----	52
4.8- PREPARO DO GEL DE AGAROSE E CORRIDA EM ELETROFORESE-----	54
4.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	56
4.9.1 Dados epidemiológicos -----	56
4.9.2- Dados Clínico-patológicos -----	57
4.9.3- Correlações entre as alterações laboratoriais e animais infectados com agentes Anaplasmataceae -----	58
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	60
5.1- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS COM CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO-----	60
5.2- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS A PCR PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE-----	63
5.3- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>E. canis</i> -----	65
5.4- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>A. platys</i> ---	66
5.5- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>A. phagocytophilum</i> -----	67
5.6-CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO-----	68
5.7-CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>Anaplasma phagocytophilum</i> COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM NEUTRÓFILOS-----	70
5.8- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>Anaplasma platys</i> COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM PLAQUETAS-----	72
5.9-CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>Ehrlichia canis</i> COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM MONÓCITOS-----	73
5.10-CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>Ehrlichia canis</i> COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM PLAQUETAS-----	74
5.11-PROPORÇÃO DE AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA <i>A. phagocytophilum</i> -----	75

5.12- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA <i>Anaplasma phagocytophilum</i> COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO-----	77
5.13- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA <i>Anaplasma phagocytophilum</i> COM AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>A. phagocytophilum</i> -----	78
5.14- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA <i>Anaplasma phagocytophilum</i> COM AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>E. canis</i> -----	80
5.15- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA <i>Anaplasma phagocytophilum</i> COM AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA <i>A. platys</i> -----	81
5.16- TAXAS DE COINFECÇÃO-----	82
5.17- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE-----	84
5.18- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>E. canis</i> ---	86
5.19- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>A. platys</i> ---	87
5.20- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>A. phagocytophilum</i> -----	88
5.21- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE-----	90
5.22- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>E. canis</i> -----	91
5.23- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>A. platys</i> -----	92
5.24-ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>A. phagocytophilum</i> -----	94
5.25- CORRELAÇÕES ENTRE AS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS E ANIMAIS INFECTADOS COM AGENTES ANAPLASMATACEAE-----	96
6- CONCLUSÕES -----	99
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	101
ANEXO 1 -----	112
ANEXO 2 -----	113

1- INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o segundo lugar em população de pequenos animais no mundo, sendo o primeiro lugar ocupado pelos Estados Unidos da América. A população atual de gatos no Brasil em 2013 era de aproximadamente 22 milhões (IBGE, 2015). A tendência é que este número continue crescendo, já que o gato é o animal doméstico que mais se ajusta ao estilo de vida do homem atualmente (OLIVEIRA, 2008).

Desde que a erliquiose canina foi descrita pela primeira vez em 1935 e reconhecida pela primeira vez nos Estados Unidos em 1962, houve muitos avanços importantes para a compreensão da diversidade dos organismos riquetsiais responsáveis pela erliquiose e anaplasmose em cães e ocasionalmente em gatos, bem como para o entendimento dos vetores capazes de transmitir esses hemoparasitas que desempenham importantes papéis como patógenos veterinários, sendo considerados agentes de doenças zoonóticas. Apesar do considerável progresso no campo, ainda há muito a ser compreendido sobre os mecanismos que contribuem para a patogênese, sobre as eficazes formas terapêuticas e estratégias de prevenção para a proteção da saúde animal (LITTLE, 2010).

O conhecimento das doenças transmitidas por carrapatos aos felinos é substancialmente menor comparado ao conhecimento das doenças transmitidas a pacientes caninos e humanos (STUBBS et al., 2000; BREITSCHWERDT et al., 2002). Evidências moleculares indicam que os gatos podem ser infectados por microrganismos *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis*. Os poucos relatos sobre a prevalência da erliquiose e anaplasmose felina em várias regiões do mundo podem ser devido à falta ou negligência de diagnósticos fidedignos para suas confirmações (BREITSCHWERDT et al., 2002; LAPPIN et al., 2004; ZOBBA et al., 2015).

No Brasil, com exceção dos hemoplasmas, até o ano de 2000 os hemoparasitas em felinos domésticos eram pouco conhecidos, existindo somente relatos esporádicos de *Ehrlichia* sp. (ALMOSNY; MASSARD, 2002). A partir desta década e após a reclassificação promovida por Dumler e colaboradores (2001), houve aumento de relatos de inúmeras espécies da família Anaplasmataceae.

A natureza inespecífica dos sinais clínicos das doenças em felinos associada à baixa sensibilidade e especificidade da técnica do esfregaço sanguíneo pode ter

resultado no subdiagnóstico e escassa notificação desses parasitas no Brasil, denotando a importância do uso de técnicas mais sensíveis como as sorológicas e moleculares. Apesar disso, são poucos os relatos envolvendo a biologia molecular no diagnóstico das hemoparasitoses de felinos no mundo (SANTARÉM et al., 2005; LIMA et al., 2010). Este raro diagnóstico da erliquiose e anaplasose felina pode estar relacionado a vários fatores, incluindo: a escassez de conhecimento de doenças transmitidas por carrapatos nesta espécie; a patogenicidade reduzida dos agentes transmitidos comparados a outros animais ou ainda a remoção rápida dos carrapatos pelos felinos, resultando na diminuição da oportunidade de transmissão da doença (STUBBS et al., 2000).

O gato não é considerado um hospedeiro reservatório para os agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. Os patógenos são mantidos em ciclos naturais e aparentemente os gatos são infectados por estes microrganismos quando os carrapatos através da picada se alimentam de seu sangue (DRYDEN et al., 2004). Contudo, os gatos que residem em casas da zona urbana, locais que possuem grande quantidade de carrapatos *Rhiphicephalus sanguineus*, podem ter alto risco de infecção. É importante relatar que grande parte dos estudos envolvendo transmissões do agente *A. phagocytophilum* é baseada em pesquisas abrangendo as espécies dos carrapatos *Ixodes* spp (BJOERSDORFF et al., 1999; LAPPIN et al., 2004).

Nos últimos anos houve um avanço no entendimento das infecções transmitidas por carrapatos devido à aplicação de técnicas moleculares, em particular a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizada no diagnóstico e identificação de agentes riquetsiais. As recentes pesquisas envolvendo biologia molecular destes parasitas confirmam a ideia de que estes agentes estão presentes em felinos e por este motivo demonstram a necessidade de estudos mais detalhados no Brasil (LIMA et al., 2010).

A distribuição geográfica destes vetores que transmitem agentes causadores da erliquiose e anaplasose tem uma influência direta sobre a prevalência da doença em uma determinada área (HINRICHSEN et al., 2001). As transmissões e infecções por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., tanto em animais quanto em humanos, ocorrem pela picada do carrapato através da inoculação do agente pela saliva deste vetor (MADIGAN, 2000).

Entretanto, é necessário lembrar que apesar da escassez de conhecimento sobre hemoparasitas, da ausência de relatos e da realização de diagnóstico, a

infecção em gatos por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. existe no Brasil e estes agentes estão presentes como potenciais parasitas, que devem receber mais atenção por parte dos médicos veterinários e pelos pesquisadores (SANTARÉM et al., 2005; LIMA et al., 2010).

O presente trabalho será de suma importância para caracterização das espécies que causam anaplasmose e erliquiose felina e para demonstrar a participação dos felinos domésticos na cadeia epidemiológica destas doenças, determinando as frequências de agentes riquetsiais na população de felinos e as características clínico-patológicas das infecções que acometem estes animais, por métodos moleculares e sorológicos associando a presença destas infecções aos parâmetros clínicos e laboratoriais.

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Caracterização dos agentes da família Anaplasmataceae que acometem os felinos domésticos e esclarecer a importância destes animais na cadeia epidemiológica das doenças riquetsiais por métodos moleculares e sorológicos associando a presença das doenças aos parâmetros clínicos e laboratoriais, esclarecendo a relevância destes agentes como hemoparasitos com alto potencial zoonótico, visando a sanidade animal e a do homem.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1- Quanto aos aspectos Imunomoleculares

- Detectar sorologicamente a presença de anticorpos IgG anti-*Anaplasma phagocitophilum* em sangues de felinos no Município de Campos dos Goytacazes pelo método de Reação por Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Identificar os agentes *E. canis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum* em felinos domésticos no Município de Campos dos Goytacazes pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.2.2- Quanto aos aspectos Epidemiológicos

- Estabelecer as frequências após a identificação dos agentes da família Anaplasmataceae em gatos domésticos, por meio da pesquisa de hemoparasitas, investigação sorológica e molecular;

- Confrontar através de proporções a especificidade e sensibilidade entre os testes utilizados para o diagnóstico de agentes da família Anaplasmataceae.

2.2.3 - Quanto aos aspectos clínico-laboratoriais

Estabelecer a associação entre as infecções promovidas pelas doenças Erliquiose e Anaplasmosose aos diferentes parâmetros clínicos-laboratoriais através de correlações estatísticas experimentais.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- RELAÇÃO TAXONÔMICA ENTRE AS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE

As espécies do gênero *Ehrlichia*, antigamente eram agrupadas seguindo as características de tropismo celular, deste modo as espécies eram divididas em formas monocíticas, enquadrando-se *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia risticii* (atualmente *Neorickettsia risticii*), formas trombocíticas, como *Ehrlichia platys* (atualmente *Anaplasma platys*) e formas granulocíticas como *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia phagocytophila* e *Ehrlichia equi*, vale ressaltar que estas duas últimas espécies foram recentemente renomeadas em uma única espécie, *Anaplasma phagocytophilum* (EVENVALL et al., 1997; BEAUFILS et al., 2002). Posteriormente foi verificado que este sistema era ineficiente, pois as infecções ocorriam em mais de um tipo celular, comprovando que o diagnóstico pelo tropismo celular não é fidedigno (COHN, 2003).

A nova classificação dos organismos se deu com o advento das técnicas de biologia molecular, agrupando as espécies através da comparação de homologia pelas sequências ribossomais (EGENVALL et al., 1997; COHN, 2003; INOKUMA et al., 2005). As similaridades permitiram o agrupamento dos patógenos e a reclassificação, cujas maiores implicações resultaram na realocação de grande parte das espécies do gênero *Ehrlichia* pertencente à família Ehrlichieae para a família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). Portanto, os gêneros que atualmente constituem a família Anaplasmataceae são *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (BEAUFILS et al., 2002; COHN, 2003; AGUIRRE et al., 2004; INOKUMA et al., 2005).

A mudança mais expressiva foi o reajuste entre os microrganismos *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* e o agente da Erliquiose Granulocítica Humana (HGE). Foi verificado através do estudo das sequências genéticas, ou seja, o estudo filogenético, que estas espécies eram muito semelhantes entre si, sendo assim deveriam ser consideradas uma mesma espécie. Os agentes conhecidos como *E. equi*, *E. phagocytophila* e HGE compartilham pelo menos 99,1% de similaridade das sequências de nucleotídeos em seus genes ribossomais (*rrs*) e possuem idênticas

sequências de aminoácidos no gene *GroEl* (DUMLER et al., 2001). Estas espécies se diferem no máximo em três nucleotídeos e por isso passaram a ser consideradas uma mesma espécie, conhecida como *Anaplasma phagocytophilum*, alocada no gênero *Anaplasma* por possuir características genéticas semelhantes às espécies deste gênero. As espécies *Anaplasma platys* e *Anaplasma bovis* foram criadas em substituição às espécies *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia bovis*, respectivamente (DUMLER et al., 2001; COHN, 2003; INOKUMA et al., 2005). A tabela 1 resume as mudanças taxonômicas de 2001 referente aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* segundo Rymaszewska e Grenda (2008).

Taxonomia dos gêneros dentro da Ordem Rickettsiales	
Taxonomia antes de 2001	Taxonomia depois de 2001
Ordem Rickettsiales	Ordem Rickettsiales
Família I- Rickettsiaceae	Família I- Rickettsiaceae
Genero I <i>Rickettsia</i>	Genero I <i>Rickettsia</i>
Genero II <i>Orientia</i>	Genero II <i>Orientia</i>
Genero III <i>Wolbachia</i> – A	
Família II Ehrlichiaeae	Família II. Anaplasmataceae
Genero I <i>Ehrlichia</i> – B	Genero I <i>Anaplasma</i>
Espécies	Espécies
<i>E. canis</i> – B2	<i>A. marginale</i>
<i>E. chaffeensis</i> – B3	<i>A. centrale</i>
<i>E. equi</i> – B4	<i>A. phagocytophilum</i> – B4
<i>E. phagocytophila</i> – B4	<i>A. platys</i> – B5
HGE – B4	<i>A. bovis</i> – B8
<i>E. platys</i> – B5	
<i>E. risticii</i> – B6	Genero IV <i>Ehrlichia</i> – B
<i>E. sennetsu</i> – B7	Espécies
<i>E. bovis</i> – B8	<i>E. canis</i> – B2
	<i>E. chaffeensis</i> – B3
Genero III <i>Anaplasma</i>	<i>E. ruminantium</i> – C
Espécies	Genero V <i>Neorickettsia</i>
<i>A. marginale</i>	Espécies
<i>A. centrale</i>	<i>N. helminthoeca</i>
Genero IV <i>Cowdria</i>	<i>N. risticii</i> – B6
Espécie	<i>N. sennetsu</i> – B7
<i>C. ruminantium</i> – C	Genero VI <i>Wolbachia</i> – A
Genero V <i>Neorickettsia</i>	
Espécie	
<i>N. helminthoeca</i>	

Tabela 1: Resumo das mudanças taxonômicas entre os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, segundo Rymaszewska e Grenda (2008). Letras A, B, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 e C, indicam uma mudança na posição sistemática.

Logicamente que as mudanças taxonômicas se deram após a diferenciação e semelhança das espécies, demonstradas no estudo filogenético, sendo representadas pela árvore filogenética da família Anaplasmataceae. Um exemplo disso foi utilizar as comparações variáveis da sequência genética, como o gene *gltA* ou *groESL*, para alguns agentes. Os agentes *A. marginale* e *A. centrale* se encontram

no mesmo ramo, mas o agente *A. phagocytophilum* e o agente *A. platys* são de ramos diferentes, pois são microrganismos que exibem mais do que 10 mol % de diferenças no conteúdo Guanina e Citosina do DNA, desta forma são consideradas espécies diferentes, pertencendo a ramos distintos e assim acontece para vários gêneros e espécies. Estas similaridades e distinções são demonstradas pela filogenia baseada na associação das sequências dos genes (3504-3566 pb) utilizando os genes específicos *rrs*, *gltA* e *groEL*. A figura 1 mostra a árvore filogenética das principais espécies da família Anaplasmataceae (PAROLLA; RAOULT, 2007).



Figura 1. Árvore filogenética da família Anaplasmataceae com base em sequências associadas aos genes *rrs*, *gltA* e *groEL* (3504-3566bp), utilizando o método de Neighbor-Joining. Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de Parolla e Raoult (2007).

3.2- GÊNERO *Ehrlichia*

No gênero *Ehrlichia* estão incluídas várias espécies patogênicas tanto para humanos quanto para animais: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, e *Ehrlichia muris* (DUMLER et al., 2001).

O agente *E. canis* parasita monócitos e é transmitido para cães, gatos, coiotes, raposas e lobos pelo carrapato *R. sanguineus*, causando a Erliquiose Monocítica Canina ou "Pancitopenia Tropical Canina", sendo considerado um agente que causa uma severa infecção e está distribuído em todo mundo. Basicamente a erliquiose canina é causada por esta bactéria sendo até hoje um importante patógeno nesta espécie animal por ser o agente causador das infecções primárias e promover severas alterações clínicas. As infecções assintomática e sintomática promovidas pelo microrganismo *E. canis* têm sido relatadas em humanos (DUMLER, 2005; LITTLE, 2010).

O cão é considerado um hospedeiro reservatório para este agente e também é o principal hospedeiro para *R. sanguineus*, carrapato amplamente encontrado no mundo, considerado o principal vetor do agente *E. canis*. Nos estágios imaturos, este carrapato é infectado no ato do repasto sanguíneo de um cão riquetsêmico e até o estágio maduro, este possui a capacidade de transmissão. A manutenção deste ciclo biológico é particularmente perigosa porque a população de *R. sanguineus* pode se estabelecer e sobreviver dentro de casa ou em canis, propiciando criar um ambiente de constante risco de infecção aos animais pela infestação do carrapato (BREMER et al., 2005).

A espécie *E. chaffeensis* infecta principalmente monócitos em humanos, sendo responsável pela Erliquiose Monocítica Humana. A infecção pode ser persistente em cervídeos, caprinos e caninos, no entanto os cervídeos são considerados os principais hospedeiros amplificadores do agente. Na América do Norte a transmissão ocorre principalmente pela picada do carrapato estrela *Amblyoma americanum*, embora as informações limitadas sugiram que o carrapato americano do cão, *Dermatocentor variabilis*, também possa desempenhar um papel na transmissão. As principais alterações no homem são febre, pancitopenia e ocasionalmente outras manifestações como meningites. A distribuição aparenta compreender apenas a América do Norte, como consequência da distribuição do carrapato estrela (PAROLA; RAOULT, 2007).

A espécie *E. ewingii* tem sido considerada apenas um patógeno canino, mas existem relatos da doença em humanos (BULLER et al., 1999). Este parasita é responsável pela erliquiose granulocítica infectando neutrófilos circulantes no sangue de cães e humanos, podendo causar febre e pancitopenia. A doença aparenta estar restringida aos Estados Unidos como consequência da distribuição de seu vetor, o carrapato estrela (DUMLER et al., 2001).

A espécie *E. ruminantium* recentemente foi renomeada porque compartilha muitas características biológicas comuns aos membros do gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001). Esta espécie é considerada o agente causador da pericardite exsudativa, uma infecção severa ocorrente em ruminantes após a picada de carrapatos do gênero *Amblyomma*, particularmente o *A. variegatum* e *A. haebreum*. A doença está limitada à África Subsaariana e ao Caribe, onde se encontra a distribuição dos carrapatos vetores (PAROLA et al., 1998). O agente infecta primariamente as células endoteliais de hospedeiros mamíferos e quando as células dos capilares cerebrais se tornam infectadas ocorre a encefalite. Recentemente, o DNA do agente tem sido detectado em pacientes jovens com encefalites na África do Sul (ALLSOPP et al., 2005).

As principais alterações clínicas provocadas pela espécie *E. muris* são linfadenomegalia e esplenomegalia em camundongos selvagens (PAROLA; RAOULT, 2007).

3.2.1- Morfologia

A morfologia das células do gênero *Ehrlichia* é muito similar às do gênero *Anaplasma*. As espécies do gênero *Ehrlichia* estão presentes em vacúolos endossomais formando mórulas em células de origem hematopoiética e para algumas espécies em células endoteliais. Por microscopia eletrônica, o envelope celular se revela de forma simples e interna, já os outros folhetos são semelhantes aos das bactérias Gram-negativas. As espécies se dividem por fissão binária e apresentam uma coloração densa e corpúsculos reticulares. Os agentes podem também produzir uma membrana abundante que se autoenvolvem ou se invaginam para dentro da célula, podendo demonstrar formas tubulares e perfis vesiculares no espaço vacuolar.

Assim como o gênero *Anaplasma*, o gênero *Ehrlichia* possui uma matriz fibrilar no espaço vacuolar (POPOV et al., 1998).

3.2.2- Interação Parasita-Hospedeiro das espécies do gênero *Ehrlichia*

As células consideradas alvo são dependentes das espécies de *Ehrlichia* que as acometem. As espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* infectam monócitos de cães e humanos, respectivamente, enquanto que *E. ewingii* infecta neutrófilos de cães e humanos. A espécie *Ehrlichia ruminantium* infecta células endoteliais e neutrófilos, principalmente no bovino. As espécies de *Ehrlichia* entram em contato com células hospedeiras por aderência à superfície de proteínas que normalmente estão glicosiladas. As bactérias são desta forma internalizadas por endossomas. Para *E. chaffeensis*, os endossomas acumulam-se de forma seletiva através de receptores de transferrina, que impedem a fusão lisossômica. A espécie *Ehrlichia muris* infecta monócitos principalmente de camundongos, contudo há relatos da infecção em humanos (BARNEWALL et al., 1999).

Apesar dos dados moleculares serem necessários para a identificação das espécies de *Ehrlichia*, o tropismo celular é importante para retratar o tipo de doença que o agente promove no homem e no animal (PAROLA; RAOULT, 2007). A tabela 2 apresenta os principais agentes do gênero *Ehrlichia*, com seus potenciais vetores, o tropismo celular na espécie hospedeira e as alterações clínicas.

Tabela 2: Espécies pertencentes ao gênero *Ehrlichia* e suas especificidades e interações biológicas segundo Parola e Raoult, 2007.

Agente <i>Ehrlichia</i>	Vetores	Células Hospedeiras	Espécie hospedeira e clínica
<i>E. Canis</i>	<i>R.sanguineus</i>	Monócitos e plaquetas	Canídeos e felinos: Erliquiose monocítica ou Pancitopenia tropical canina
<i>E. chaffensis</i>	<i>A. americanum</i> ; <i>D. variabilis</i>	Monócitos	Humano, cervídeos, caninos, pequenos ruminantes: Erliquiose monocítica humana
<i>E. ewingii</i>	<i>A. americanum</i>	Neutrófilos	Caninos e humanos: Erliquiose granulocítica (febre leve a moderada e pancitopenia)
<i>E. ruminantium</i>	<i>A. Variegatum</i> ; <i>A. haebreum</i>	Endotelíocito	Ruminantes: Pericardite exsudativa
<i>E. muris</i>	<i>Haemaphysalis flava</i>	Monócito	Camudongos selvagens: Linfadenopatia e esplenomegalia

3.3- GÊNERO *Anaplasma*

O gênero *Anaplasma* é constituído por três espécies que infectam os eritrócitos, uma espécie que infecta as plaquetas e duas espécies que infectam as células brancas (PAROLA; RAOULT, 2007).

Dentre as espécies que infectam as hemácias, a espécie *Anaplasma marginale* é responsável pela anaplasmosose bovina, doença conhecida por provocar uma severa anemia hemolítica que ocorre em bovinos após a transmissão do agente pelo carrapato *Dermacentor andersoni* na América do Norte, pelo *Rhipicephalus boophilus microplus* na África e pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus* na América do Sul, sendo considerada uma infecção ocorrente em todo o mundo. A espécie *Anaplasma centrale* causa alterações similares, porém é considerada uma doença moderada ocorrente também no bovino. Já a espécie *Anaplasma ovis* atua apenas em ovinos e caprinos (RIOCHE, 1966).

A espécie *A. platys* é considerada o agente causador da trombocitopenia infecciosa cíclica em cães e gatos, uma doença caracterizada por oscilações de febre e também trombocitopenia. O agente é transmitido ao animal através da picada dos carrapatos *R. sanguineus* ou *Amblyoma sp.* (ALMOSNY; MASSARD, 1999).

O agente *A. bovis* infecta os monócitos de bovinos, sendo a espécie causadora da erliquiose bovina na África, no Oriente Médio, Índia e Sri Lanka. A doença é caracterizada clinicamente pela linfadenopatia, apatia, anorexia, diarreia, não

frequentemente envolvimento do sistema nervoso central e ocasionalmente o óbito. Também podem ocorrer a leucopenia e trombocitopenia. O agente *A. bovis* é transmitido por carrapatos incluindo *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyoma variegatum* na África e possivelmente por *Amblyoma cajennense* em Guadalupe e no Brasil. O agente *A. bovis* também tem sido detectado nas Américas e a sequência genética rrs referente à bactéria *A. bovis* tem sido detectada em coelhos da Ilha de Nantucket nos Estados Unidos, determinando que este animal possa ser considerado um hospedeiro para o agente (PAROLA; RAOULT, 2007).

A Anaplasmoze Granulocítica Humana é causada pelo agente *A. phagocytophilum*, que por sua vez infecta ruminantes tais como bovinos, ovinos e caprinos causando a "febre dos pastos" ou "febre dos carrapatos" (PAROLA; RAOULT, 2007). A infecção em cavalos se refere à anaplasmoze granulocítica equina e em humanos se refere à anaplasmoze granulocítica humana. Os roedores são comumente infectados e nestes a doença é transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* como *Ixodes dammini* e *Ixodes pacificus* nos Estados Unidos e *Ixodes ricinus* e *Ixodes trianguliceps* na Europa. As células alvo desta espécie são os granulócitos e as principais alterações são febre, leucopenia e trombocitopenia. Os danos hepáticos têm sido relatados em humanos (PAROLA, 2004).

3.3.1- Morfologia

As bactérias que compõem o gênero *Anaplasma* são pequenas, pleomórficas ou cocoides medindo de 0,3 a 0,4 μm de diâmetro e são encontradas em mamíferos como formas de corpúsculos de inclusão (mórulas) em células hematopoiéticas imaturas e maduras (RIKIHISA et al., 1991).

Os microrganismos aparecem como inclusões circulares intracelulares nas células coradas em roxo-azulado pelos métodos de Romanowsky. As espécies do gênero *Anaplasma* são bactérias Gram-negativas e imóveis. Por microscopia eletrônica a espécie *A. phagocytophilum* é verificada com vacúolos de membrana, que representam formas endossomais iniciais (POPOV et al., 1998).

3.3.2- Interação Parasita-Hospedeiro das espécies do gênero *Anaplasma*

Até o momento carrapatos do gênero *Ixodes* (*Ixodes ricinus*) são os principais vetores das espécies do gênero *Anaplasma*. As espécies *D. andersoni*, *Rhipicephalus boophilus microplus*, *I. dammini*, *I. pacificus* e *I. ricinus*, dentre outras, são importantes vetores biológicos. As moscas também podem atuar como vetores mecânicos e contribuir na transmissão do agente *A. marginale*. As bactérias do gênero *Anaplasma* podem ser mantidas no mesmo vetor pela persistência em larvas até a fase adulta, no entanto, não há transmissão ovariana (transmissão para ovos). Desta forma, os carrapatos são considerados apenas vetores e não reservatórios (LITTLE, 2010).

Os ruminantes, especialmente cervídeos, são considerados os principais hospedeiros amplificadores das bactérias do gênero *Anaplasma*, mas, já houve relatos de pequenos mamíferos como camudongos e outros roedores serem reservatórios para a espécie *A. phagocytophilum* (PAROLA; RAOULT, 2007).

Ghafar e colaboradores (2012) relataram a primeira caracterização molecular de *A. phagocytophilum* em *R. sanguineus* no Egito, sugerindo que esta espécie de carrapato pode atuar como um importante vetor para uma determinada cepa do agente causador da Anaplasmoze Granulocítica Humana.

Anaplasma platys foi primeiramente descrito em cães nos Estados Unidos em 1978 e desde então começou a ser descoberto em todo mundo. A transmissão ocorre pelo carrapato *R. sanguineus*, o mesmo vetor do agente *E. canis*. A espécie *A. platys* promove uma doença branda, mas associada a outra bactéria como *E. canis* na forma de coinfeção pode resultar em uma severa patologia clínica (LITTLE, 2010).

De acordo com Parola e Raoult (2007), as espécies *A. marginale* e *A. centrale* são causadoras de anemias hemolíticas em bovinos por parasitarem hemácias, já a espécie *A. ovis* parasita eritrócitos de ovinos. As bactérias *A. platys* parasitam plaquetas, o que resulta em trombocitopenia principalmente em cães. Em bovinos, *A. bovis* infecta os monócitos, sendo o agente causador da anaplasmoze monocítica. A espécie *A. phagocytophilum* é responsável pela Anaplasmoze granulocítica por parasitar neutrófilos tanto de animais quanto de humanos. A tabela 3 representa os principais agentes do gênero *Anaplasma*, com seus potenciais vetores, o tropismo celular na espécie hospedeira e as alterações clínicas.

Tabela 3: Espécies pertencentes ao gênero *Anaplasma* e suas especificidades e interações biológicas segundo Parola e Raoult, 2007.

Agente Anaplasma	Vetores	Células Hospedeiras	Espécie hospedeira e clínica
<i>A. marginale</i>	<i>Dermatocentor</i>	Hemácias	Bovino: Anemia hemolítica severa
<i>A. centrale</i>	<i>Rhipicephalus andersoni</i> , <i>Rhipicephalus boophilus</i> , <i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Hemácias	Bovino: Anemia hemolítica moderada
<i>A. ovis</i>		Hemácias	Ovino: Anemia hemolítica
<i>A. platys</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Amblyoma</i> sp	Plaquetas	Cães e gatos: Trombocitopenia infecciosa cíclica (febres intermitentes)
<i>A. bovis</i>	<i>Rhipicephalus</i> sp e <i>Amblyoma</i> sp	Monócitos	Bovino: febre, anorexia, diarreia, comprometimento SNC;
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Ixodes</i> spp; atualmente <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Neutrófilo	Humano, Equino, Felino, alguns ruminantes

3.4- ERLIQUIOSE E ANAPLASMOSE NA ESPÉCIE FELINA

Os membros da família Anaplasmataceae podem causar doenças em muitas espécies animais, como cães, cavalos, ruminantes, roedores e humanos (NEER; HARRUS, 2006). As doenças promovidas pelos agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. nos felinos domésticos não são bem compreendidas e raramente se manifestam como em cães (STUBBS et al., 2000). Aparentemente o felino é menos predisposto a doenças transmitidas por carrapatos do que os cães, incluindo a erliquiose e a anaplasmoze, embora em muitos casos estes animais compartilhem o mesmo habitat, desta forma espera-se que as infecções que acometam os gatos sejam causadas pelos mesmos agentes do cão (TABAR et al., 2008; SANTIAGO, 2010).

A erliquiose e anaplasmoze são enfermidades diagnosticadas com pouca frequência em comparação a outras doenças do gato, possivelmente devido ao pouco conhecimento das doenças transmitidas por carrapatos aos felinos, também devido a menor patogenicidade destas infecções nestes animais, a resistência imunológica inata ou adaptação à infecção (SHAW et al., 2005; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2010). Outra causa possível é o comportamento dos gatos de retirar os carrapatos através da lambadura, não oferecendo oportunidade para a ocorrência da infecção (BREITSCHWERDT, 2003) ou ainda uma reduzida interação do animal com o vetor (EBERHARDT, 2006). Apesar de todos estes mecanismos, existem relatos na

literatura de doenças riquetsiais (erliquiose e anaplasnose) em felinos (AGUIRRE et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2006; BILLETTER et al., 2007; TABAR et al., 2008; LIMA et al., 2010; SANTIAGO, 2010).

A primeira evidência da ocorrência natural da erliquiose felina foi descrita por Charpertier e Groulade (1986) na França. A erliquiose felina foi posteriormente relatada em 1989, por Buoro e colaboradores, na qual descreveram inclusões intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos em gatos do Quênia. Anos após foram relatadas mórulas em esfregaços sanguíneos de felinos nos Estados Unidos, França, Brasil e Suécia (BOULOY et al., 1994; BEAUFILS et al., 1995; ALMOSNY; MASSARD; 1999; BJOERSDORFF et al., 1999).

Sabe-se que os felinos são susceptíveis às infecções experimentais por *A. phagocytophilum*, no entanto as tentativas de infecções experimentais por *E. canis* não têm sido relatadas. Ocorrências naturais destas infecções ou doenças têm sido documentadas nos felinos e as principais alterações clínicas são febre, letargia e anorexia (BJOERSDOFF et al., 1999; BREITSCHWERDT et al., 2002; TARELLO, 2005). A identificação específica de uma alguma espécie é difícil pelos métodos convencionais, mas os agentes têm sido identificados através de técnicas moleculares (LITTLE, 2010).

As pesquisas realizadas nas amostras sanguíneas de felinos têm demonstrado que 4,3% dos felinos nos Estados Unidos e 30% dos felinos em regiões endêmicas possuem reações por anticorpos contra *A. phagocytophilum* pela imunofluorescência indireta. Não há evidências sorológicas para *E. canis* na América do Norte, mas há relatos na Europa (AGUIRRE et al., 2004; MAGNARELLI et al., 2005; BILLETTER et al., 2007). Dados sorológicos oriundos de pesquisas têm sugerido possíveis infecções em felinos, porém os mesmos não corroboram aos dados da PCR, o que sugere que a utilização dos ensaios sorológicos possa ser limitada (BREITSCHWERDT et al., 2002). Contudo, as pesquisas têm demonstrado que a identificação de animais infectados por *Ehrlichia* spp. e *Anplasma* spp. pelo PCR ocorre em animais doentes, devido às infecções provocadas por estes agentes, o mesmo não é verificado em animais saudáveis (AGUIRRE et al., 2004; LAPPIN et al., 2004; SOLAN-GALLEGO et al., 2006).

3.5- ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

Há poucas evidências de que a infecção pelo gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma* possa causar doenças tanto na forma monocítica quanto granulocítica nos felinos, no entanto as formas granulocíticas são as menos documentadas. Contudo, a espécie *A. phagocytophilum* pode infectar o gato experimentalmente (LEWIS et al., 1975; FOLEY et al., 2003). Além disso, demonstrou-se a existência de infecções naturais por *A. phagocytophilum* em felinos através de técnicas moleculares (BJÖERSDORFF et al., 1999, LAPPIN et al., 2004; SHAW et al., 2005; BILLETER et al., 2007; SANTIAGO, 2010). Também foram detectados corpúsculos de inclusão compatíveis com *A. phagocytophilum* em neutrófilos (TARELLO, 2005), assim como reações sorológicas contra esse agente (BJÖERSDORFF et al., 1999, LAPPIN et al., 2004; MAGNARELLI et al., 2005, SOLANO-GALLEGO et al., 2006; BILLETER et al., 2007; SANTIAGO, 2010). Este agente é responsável pela chamada Anaplasmoose Granulocítica Felina (TARELLO, 2005; SANTIAGO, 2010).

As taxas de soroprevalência encontradas em diferentes países variam muito, sendo encontrados valores entre 1% e 82,4% para *E. Canis* (BOULOY et al., 1994; STUBBS et al., 2000; AGUIRRE et al., 2004, SOLANO-GALLEGO et al., 2006), e entre 1,8% e 38% para *A. Phagocytophilum* (AGUIRRE et al., 2004; MAGNARELLI et al., 2005, SOLANO-GALLEGO et al., 2006; BILLETER et al., 2007).

Billeter e colaboradores (2007) analisaram 460 amostras sanguíneas de felinos domésticos em várias regiões dos Estados Unidos e detectaram 4,3% de amostras sororeagentes para *A. phagocitophilum* através da reação por imunofluorescência indireta (RIFI), porém com resultados negativos para as análises das reações em cadeia da polimerase (PCR). Aguirre e colaboradores (2004), ao pesquisarem amostras de 122 felinos na Espanha, verificaram 6 amostras reagentes na sorologia, porém negativas na PCR.

Na cidade de Campos dos Goytacazes, Brasil, Correa e colaboradores (2011) demonstraram algumas informações de prevalência destes hemoparasitas. No referido estudo 9,89% dos gatos apresentaram formas compatíveis com corpúsculos de inclusão. No mesmo trabalho foram verificados 13,18% de gatos com *Anaplasma platys* pela PCR e nenhuma evidência de felinos com *Ehrlichia* sp. Outro trabalho,

realizado por Zobba e colaboradores (2015), identificou que 31,11% dos felinos eram positivos para *A. platys* através avaliação da PCR.

3.6- PATOGENIA

A patogênese da doença em gatos é desconhecida. Baseada em sinais e sintomas clínicos e achados laboratoriais encontrados na espécie felina, a patogenia da doença poderia ser semelhante às infecções em cães. Assim como no cão, a imunossupressão pode favorecer o desenvolvimento da erliquiose em gatos (BEAUFILS et al., 1995). De fato, alguns autores consideram que estas são infecções oportunistas e uma vez diagnosticadas deve-se investigar alguma outra doença concomitante, especialmente nos casos em que não há melhora após a introdução do tratamento adequado para a erliquiose (BEAUFILS et al., 1999).

3.7- DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

O diagnóstico da erliquiose e anaplasmosose se dá pela associação de vários fatores como a detecção de mórulas em esfregaços sanguíneos ou em amostras teciduais, como baço, medula óssea ou linfonodos, a presença de sinais e sintomas clínicos compatíveis com as referidas doenças, elevados títulos de anticorpos e respostas eficazes ao tratamento. Mais recentemente, técnicas moleculares e a sorologia estão sendo utilizadas para o diagnóstico dessas doenças nos felinos domésticos (BOULOY et al., 1994, PEAVY et al., 1997; BEAUFILS et al., 1999; BJËRSORFF et al., 1999; TARELLO, 2005; LITTLE, 2010).

3.7.1- Sinais, sintomas clínicos e alterações laboratoriais

Os sinais e sintomas predominantes relatados em felinos domésticos com erliquiose incluem febre, anorexia, letargia, mialgia, dispneia e linfadenomegalia (LAPPIN et al., 2004). Em geral as anormalidades em felinos são inespecíficas e semelhantes às da erliquiose canina (NEER, 1998). A presença de poliartrite também tem sido relatada, da mesma forma que as alterações laboratoriais como anemia, trombocitopenia e pancitopenia (STUBBS et al., 2000; BREITSCHEWERDT et al., 2002). Sinais similares também são descritos na infecção destes animais pelo agente *A. phagocytophilum* e incluem febre, dor nas articulações, linfadenomegalia, perda de peso, doenças periodontais, conjutivites e sinais neurológicos (LAPPIN et al., 2004; TARELLO, 2005).

3.7.2- Diagnóstico laboratorial

3.7.2.1- Avaliação direta dos esfregaços sanguíneos ou imprints

A verificação de mórulas em células infectadas através da microscopia dos esfregaços sanguíneos é suficiente para a confirmação do diagnóstico da erliquiose ou anaplasmose. Infelizmente, as mórulas não são visualizadas facilmente em amostras de animais infectados, particularmente em felinos infectados pelo agente *E. canis* que geralmente causa uma grave doença clínica (DAWSON et al., 2005; TARELLO, 2005).

A detecção de mórulas é mais comum na fase aguda das doenças, mas o diagnóstico por esta técnica não é fácil. Também é possível detectar as mórulas a partir de esfregaços de aspirados ou *imprints* de linfonodos ou outros tecidos (BOULOY et al., 1994). Uma forma de visualização é através de preparações de aspirados de medula óssea, que podem aumentar a probabilidade de identificar estas mórulas em células hematopoiéticas, principalmente na forma crônica da doença em

que a identificação de mórulas é rara através da visualização dos esfregaços sanguíneos pela microscopia (LITTLE, 2010).

Tanto em cães quanto em humanos com erliquiose, a citopatologia da medula óssea pode variar intensamente, em particular a respeito da duração da infecção antes da amostragem (ABOTT et al., 1991). Os mecanismos pelos quais as espécies do gênero *Ehrlichia* induzem as alterações na medula óssea, particularmente hipoplasia ou mielofibrose, continuam a ser mal compreendidos (BREITSCHWERDT et al., 2002).

Em contraste, o agente *A. phagocytophilum* pode ser encontrado em granulócitos, principalmente nos neutrófilos de indivíduos com infecção aguda (GOODMAN, 2005). As mórulas de *A. platys* podem ser encontradas em plaquetas, mas em alguns casos, podem ser difíceis de ser distinguidas de grânulos plaquetários (BAKER et al., 1987; LITTLE, 2010).

3.7.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As técnicas moleculares como a PCR podem ajudar a definir o estado de infecção e foram recentemente utilizadas no diagnóstico de doenças transmitidas por vetores em gatos e em particular no diagnóstico da erliquiose felina (BJÖERSDORFF et al., 1999).

Para verificar se o paciente se encontra riquetsêmico deve-se utilizar a amostra sanguínea, que possivelmente contém o agente Anaplasmataceae e posteriormente proceder a identificação da infecção através da PCR em laboratórios de referência. A confirmação da positividade na PCR resulta no diagnóstico e é considerada uma evidência de infecção, apesar de várias técnicas serem utilizadas entre diferentes laboratórios de diagnóstico (LITTLE, 2010).

As interpretações de resultados negativos nos ensaios de PCR são mais difíceis e não devem ser utilizadas como regra para justificar a ausência de infecção. Os resultados negativos podem acontecer quando estes microrganismos na amostra sanguínea estão abaixo do limite de detecção, como pode acontecer quando o progresso da infecção é interrompido pelo tratamento por antibióticos, ou na falha da extração do DNA do agente na amostra sanguínea, na primeira etapa do processo de

PCR, não gerando produto de DNA extraído. Para o clínico, estas observações enfatizam a importância de se obter amostras de sangue para teste de PCR antes do início do tratamento com antibiótico (BREITSCHWERDT et al., 2003). Outra questão importante ocorre durante a fase crônica da doença, onde a taxa de riquetsemia está baixa devido à evasão de microrganismos para outros tecidos, principalmente mielolinfoides (LAPPIN et al., 2004).

Lappin e colaboradores (2004) relataram a infecção por *A. phagocytophilum* pela PCR e sequenciamento do DNA em quatro gatos jovens (menos de 3 anos de idade) no nordeste dos Estados Unidos. Os resultados moleculares sugerem que a doença clínica aparece frequentemente em felinos jovens, no entanto, estes resultados não impedem a infecção em felinos senis. A dificuldade da amplificação do DNA em felinos idosos pode ser devido à baixa sensibilidade do diagnóstico pelas baixas quantidades de DNA para amplificação pela PCR.

Bjoersdorff e colaboradores (1999) amplificaram e sequenciaram o gene 16S rDNA de uma amostra sanguínea obtida de um gato de 14 anos de idade da Suécia que foi 100% semelhante às cepas de *A. phagocytophilum* de cães e cavalos da mesma região. Alguns trabalhos descreveram a infecção por *E. canis* em felinos jovens do sudeste dos Estados Unidos, leste do Canadá e na França (BREITSCHWERDT et al., 2002, BEAUFILS et al., 2002).

Baseado na amplificação e sequenciamento do DNA, o DNA amplificado do gênero *Ehrlichia* no sangue de felinos da Suécia foi semelhante ao comparado com as sequências de DNA obtidas de *E. canis* em cães, sugerindo que se tratavam de mesma cepa (BJOERSDORFF et al., 1999).

3.7.2.3- Sorologia

Por muito tempo os ensaios sorológicos têm sido utilizados no diagnóstico da erliquiose e anaplasmose, para evidenciação de pacientes que possuam os agentes infecciosos causadores destas doenças. Os ensaios de imunofluorescência indireta para *E. canis* e *A. phagocytophilum* são amplamente utilizados nos laboratórios de diagnóstico. Estes testes são considerados de baixa especificidade, embora altamente sensíveis, pois reações cruzadas entre espécies de mesmo gênero são

comuns de acontecer (WANER et al., 2001). Testes rápidos imunoenzimáticos desenvolvidos para detecção de anticorpos contra antígenos específicos de *E. canis* e *A. phagocytophilum* têm sido utilizados frequentemente, como por exemplo 3Dx/4Dx SNAP, IDEXX Laboratories®. A reação para *E. canis* pelo 4Dx SNAP tem reagido com anticorpos gerados contra *E. chaffencis*, em reação cruzada, da mesma forma que a reação para *A. phagocytophilum* ocorre em pacientes com *A. platys* (O'CONNOR et al., 2006).

A reação por imunofluorescência indireta (RIFI) (BOULOY et al., 1994; BJÖERSDORFF et al., 1999), o Western blot (MATTHEWMAN et al., 1996; PEAVY et al., 1997) e o ELISA (ensaio imunoenzimático) são métodos amplamente utilizados, mas devem ser combinados com outras técnicas de diagnóstico, já que um resultado negativo não exclui a infecção e também nem todos os animais reagentes apresentam sinais clínicos da doença, portanto como acontece com o cão, a sorologia deve ser interpretada em conjunto com outros dados (BOULOY et al., 1994; MADIGAN et al., 1995).

Independente do ensaio sorológico usado, a doença clínica pode se desenvolver antes de uma soroconversão, por esta razão, as reações negativas não devem descartar o diagnóstico da presença da erliquiose ou anaplasose em pacientes na forma aguda da doença (NICHOLSON et al., 2010). Cães saudáveis podem demonstrar reações positivas sem qualquer presença de sinais da doença, pois os níveis de anticorpos podem se manter elevados mesmo após a eliminação do agente pelo sistema imune ou tratamento. Os animais que toleram a infecção sem desenvolvimento da doença clínica podem apresentar persistência dos níveis de anticorpos por meses ou até anos depois do tratamento (LITTLE, 2010). A persistência de altos níveis de anticorpos é particularmente comum em animais infectados com *E. canis*, possivelmente devido à persistência do agente ou devido à reinfeção. Pelo motivo de muitos animais apresentarem altos títulos de anticorpos para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., mesmo em animais clinicamente normais, estes resultados não são claros e fidedignos para confirmação da infecção (HEGARTY et al., 2015).

3.8- TRATAMENTO DAS DOENÇAS RIQUETSIAIS

A doxiciclina é considerada o tratamento de escolha para as infecções riquetsiais. É recomendado pelo Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária a dosagem de 10 mg/kg via oral a cada 24 horas durante 28 dias para as doenças erliquiose e anaplasnose. A recuperação do paciente doente pelo tratamento com a doxiciclina é difícil, da mesma forma que o atraso no tratamento pode ocasionar o óbito. A melhora clínica é observada na maioria das vezes até 2 dias após o início da antibioticoterapia, sendo que a falta de resposta ao tratamento possa sugerir uma outra etiologia para as alterações encontradas. Embora o estado clínico do paciente melhore na primeira etapa do tratamento, ou seja nos primeiros 14 dias, a terapia não pode ser interrompida e o tratamento deve ser mantido até os 28 dias preconizados. Outras opções de tratamento com antibióticos, como segunda escolha para as infecções por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. incluem o imidocarb e rifamicina. Em pacientes gravemente afetados, as terapias de suporte simultâneas, tais como transfusão de sangue, administração de fluidos e o uso de prednisona parenteral podem ser benéficas, embora corticosteroides possam induzir recaídas e recrudescência em pacientes com infecções subclínicas (ALLISON; LITTLE, 2013).

3.9- POTENCIAL ZOONÓTICO

Com exceção do agente *A. platys*, os agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. que causam doenças em animais também são conhecidos por serem agentes zoonóticos (NICHOLSON et al., 2010). Os agentes *E. Chaffeensis* e *A. phagocytophilum* são bem conhecidos como patógenos humanos, responsáveis pela Erliquiose Monocítica Humana e Anaplasnose Granulocítica Humana, respectivamente (BAKKEN; DUMLER, 2008) . Da mesma forma, ocasionalmente os agentes *E. Canis* e *E. Ewingii* podem infectar o homem (PEREZ et al., 2006).

As doenças no homem se apresentam com alguns sinais clínicos predominantes, como febre, mialgia, dor de cabeça e desorientação. Da mesma forma que nos animais domésticos, a infecção é transmitida ao homem através do carrapato

e não se imagina que os animais possam ser responsáveis pelo aumento do risco de infecção nos humanos por serem os principais hospedeiros para os agentes e vetores. Portanto, as recomendações para a prevenção da infecções em humanos são similares às realizadas em pets, obviamente com o foco principal no controle do carrapato (LITTLE, 2010; NICHOLSON et al., 2010).

O gato pode ser um reservatório desses agentes que podem também infectar os seres humanos, sem apresentar sinais compatíveis com a doença. De fato, em alguns casos, o agente do gênero *Ehrlichia* detectado em gatos é idêntico ao encontrado no homem que convive com o animal (BJÖERSDORFF et al., 1999). *E. Chaffeensis*, que causa doença em humanos, pode possuir reação cruzada com a *E. Canis*, no teste sorológico para *E. canis*. É possível que os casos de humanos soropositivos para a *E. Canis* sejam devidos a *E. Chaffeensis*, constituindo um risco potencial para o homem (STUBBS et al., 2000).

Relatos em humanos relacionados à presença de *Rickettsia* sp e *Anaplasma* sp. também têm sido descritos em diferentes partes do mundo. Na Venezuela foi descrito a presença de *Ehrlichia* sp em plaquetas de doze pacientes HIV-positivos (TAMI; TAMI-MAURY, 2004). No Brasil, foram identificados nove casos de erliquiose por *E. chaffeensis* em Juiz de Fora – MG, foram 771 pacientes febris investigados em três centros de saúde entre 2001 e 2005 (COSTA, 2006). Desde 2007, na China, 713 casos de Anaplasmoze Granulocítica Humana (causada por *A. phagocytophilum*) foram relatados, sendo 26 mortos só em 2010 (Portal G1). O agente *A. phagocytophilum* promove a doença em animais, como cães, felinos, cavalos e inclusive humanos. Sendo de extrema relevância por ser considerada uma doença antropozoonótica (DUMLER et al., 2007; BAKKEN; DUMLER, 2008; LITTLE, 2010).

Entretanto, até agora não há nenhum estudo demonstrando que a convivência com gatos é um fator de risco para a infecção no homem por estes hemoparasitas. O mais importante é que uma vez que os gatos são suscetíveis e são infectados pelos mesmos organismos que afetam os seres humanos, eles potencialmente podem atuar como reservatórios destes agentes e os vetores podem transmiti-los ao homem (NEER; HARRUS, 2006).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- AMOSTRAGEM

O projeto foi aceito pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro sob o protocolo de nº 215. Foram obtidas amostras sanguíneas de 60 felinos domésticos ao acaso independente da sanidade, sendo estes provenientes de atendimentos no Hospital Veterinário da UENF, atendimentos particulares e gatis do município de Campos dos Goytacazes (Norte do estado do Rio de Janeiro), RJ.

Os animais atendidos passaram por exames clínicos para o preenchimento de fichas clínicas, devidamente padronizadas para todos os animais, e laboratoriais com a intenção de se encontrar principalmente alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com a anaplasmose e erliquiose.

4.2- REQUISITOS DE INCLUSÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS NA FICHA CLÍNICA

Todos os animais foram atendidos independente da sanidade e foi realizado o preenchimento dos dados na ficha clínica para definir as alterações clínicas compatíveis com as doenças riquetsiais. A ficha clínica está contida no anexo 1. O preenchimento visou determinar as alterações clínicas que são compatíveis com as promovidas pelas infecções por *Anaplasma* spp. ou *Ehrlichia* spp. Desta forma, posteriormente estes dados foram necessários para a realização das análises estatísticas descritivas e não paramétricas, para assim determinar as principais alterações clínicas e laboratoriais nos animais que possuem as infecções causadas por agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp e verificar a associação da presença de alterações laboratoriais com a presença das doenças.

As alterações clínicas que foram adicionadas à ficha clínica são as mesmas relatadas por vários autores e justificam a suspeita de infecção pelos agentes

riquetsiais. As principais alterações citadas são: anorexia, perda de peso físico (emagrecimento ou caquexia), febre intermitente, letargia, edema, êmese, poliartrite e dificuldade de locomoção, afecções oculares, esplenomegalia, linfadenomegalia, mucosas pálidas, presença de vetores e desidratação (STUBBS et al., 2000; ALMOSNY; MASSARD, 2002; ETTINGER; FELDMAN; 2004).

4.3- LOCAIS DE REALIZAÇÃO DAS PESQUISAS

Para a realização do experimento e aprendizado de todas as técnicas, os treinamentos no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília – UnB, Brasília (DF) e no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-SVS/MS e de Referência Estadual em Ácari-SES/RJ do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, no ano de 2010 e 2013, respectivamente, foram essenciais para adquirir conhecimento teórico e prático, aprendendo as técnicas convencionais em Biologia Molecular e de Imunofluorescência Indireta. Da mesma forma, foram realizados os treinamentos de biossegurança, gestão da qualidade e ambiente para realização da pesquisa em tais laboratórios, importantes para a realização dos devidos procedimentos das análises laboratoriais.

Após estes treinamentos, parte do experimento foi realizado na Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais e no setor de Patologia Clínica do Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.

Primeiramente, as técnicas de Reação por Imunofluorescência Indireta foram realizadas no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-SVS/MS e de Referência Estadual em Ácari-SES/RJ do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz em 2013. Posteriormente, as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da FAV/ UnB no ano de 2015.

4.4- COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL

4.4.1- Aquisição das amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas coletadas dos animais no ato do atendimento foram acondicionadas e transportadas para o setor de Patologia Clínica para avaliação hematológica e bioquímica sérica. Foi realizada a contenção física do felino e a coleta realizada por flebocentese cefálica utilizando-se seringas de 5 mL e scalp 21', obtendo-se a amostra sanguínea (2,0 – 4.0 ml), onde parte desta foi armazenada em frascos (Vacuette®) contendo Etileno Diaminotetracético Tripotássico (EDTA K₃), já para a realização dos exames bioquímicos séricos, 2 ml da amostra sanguínea foram acondicionados em tubos sem anticoagulante visando à obtenção de soro. As amostras sanguíneas foram transportadas e armazenadas a 4°C, sendo enviadas no tempo máximo de 20 minutos para o laboratório para avaliação hematológica e bioquímica.

Em seguida foi procedida a coleta das amostras sanguíneas para a avaliação laboratorial de rotina incluindo a pesquisa de hemoparasitas, hemograma e análises bioquímicas. As amostras dos felinos suspeitos devidamente processadas e acondicionadas foram utilizadas para os procedimentos dos testes de triagem para investigação dos agentes, como a Reação por Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.4.2- Avaliação de hemoparasitas em microscopia óptica

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos a partir de sangue periférico obtido da borda de orelha de cada animal, coletado por punção auricular interna utilizando-se agulha fina, aproveitando apenas a primeira gota de sangue. Estes foram corados com o kit Instant Prov (panótico rápido) da marca Newprov®, sendo considerada uma das técnicas de Romanowsky e posteriormente visualizados a microscopia óptica com objetiva de imersão em aumento de 100X em microscópio Nikon®, à procura de corpúsculos elementares (iniciais ou mórulas) em leucócitos e

plaquetas, com o propósito de identificar agentes da família Anaplasmataceae na amostra, caracterizando uma possível positividade.

4.4.3- Realização de hemograma e testes bioquímicos

O hemograma foi realizado utilizando-se o equipamento automatizado da marca Labtest®, SDH-3, a partir das amostras sanguíneas contidas em tubos com anticoagulante. Para realização da bioquímica sérica utilizaram-se os soros sanguíneos, obtidos após a coagulação e centrifugação a $1,26 \times 10^4$ G por cinco minutos em centrífuga da marca RCE®. Posteriormente os soros foram armazenados em microtubos de 500µl, parte destes soros foi pipetada e acondicionada em microtubos à temperatura de -20 °C, para a posterior realização da sorologia. Os testes bioquímicos foram realizados utilizando-se kits da marca Labtest®, mensurando-se proteínas totais séricas, albumina sérica, fosfatase alcalina sérica, gama glutamiltransferase sérica, alanina aminotransferase sérica, aspartato aminotransferase sérica, uréia e creatinina séricas em espectrofotômetro semiautomatizado da marca BTS 310 Biosystems®.

As principais alterações hematológicas e bioquímicas compatíveis com as infecções foram avaliadas e compiladas para análises dos dados estatísticos. As alterações hematológicas e bioquímicas, frequentemente verificadas e relatadas por autores, foram preenchidas na ficha laboratorial (Anexo 2) e correspondem a: Anemia arregenerativa (normocítica normocrômica), trombocitopenia, leucopenia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, elevações das enzimas Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase, elevações dos marcadores renais Uréia e creatinina séricas, e inclusões citoplasmáticas de corpúsculos ou mórulas dos agentes em monócitos, granulócitos e plaquetas (ALMOSNY; MASSARD, 2002). De fato, a verificação pela microscopia óptica de corpúsculos de inclusão (formas reprodutivas dos agentes) em células das amostras sanguíneas foi um critério para adicionar a amostra como suspeita, independente do paciente felino possuir alguma alteração clínica.

4.5- REAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

4.5.1- Realização dos ensaios imunológicos

Considerado um dos testes de alta sensibilidade para identificação de anticorpos contra agente riquetsial pesquisado na amostra sanguínea, foi realizada esta segunda etapa do trabalho, que consiste na Reação por imunofluorescência indireta (RIFI) após as análises laboratoriais de rotina. A presença de amostras reagentes para *A. phagocytophilum* foi de suma importância para determinação deste agente e posteriormente este teste foi confrontado com as análises moleculares para validação de sua acurácia. No entanto, a possibilidade de reação cruzada não pôde ser descartada, pois a presença deste agente pode ocasionar na reação cruzada principalmente com *A. platys* e com *E. canis*, apesar de alguns autores descreverem que a imunofluorescência indireta seja considerada um ensaio específico (WANER et al., 2001; LAPPIN et al., 2004; BILLETTER et al., 2007). Como critério de avaliação, as amostras de todos os animais, inclusive as que foram reagentes para *A. phagocytophilum*, foram também selecionadas para investigação molecular dos agentes *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *A. platys*, a fim de descartar a possibilidade de reação cruzada (INOKUMA et al., 2002).

Foram utilizados os soros pipetados e acondicionados em microtubos à temperatura de - 20 °C das amostras coletadas para a realização dos testes sorológicos, tendo em vista a pesquisa por anticorpos IgG anti-*Anaplasma phagocytophilum*.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-SVS/MS e de Referência Estadual em Ácari-SES/RJ do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz.

O teste de Imunofluorescência indireta baseou-se na detecção indireta de anticorpos IgG, sendo considerada uma análise semiquantitativa dos anticorpos da classe IgG felina para *A. phagocytophilum*, realizado sob vários graus de diluições para obtenção de titulações de reações. Foi utilizado Kit de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Anaplasma phagocytophilum* / Anticorpos IgG conjugado felino da marca Fuller Laboratories® como verificado na figura 2. As lâminas contêm células

cultivadas com uma quantidade de agentes da espécie *A. phagocytophilum* capazes de promover reação com os anticorpos dos soros amostrais.

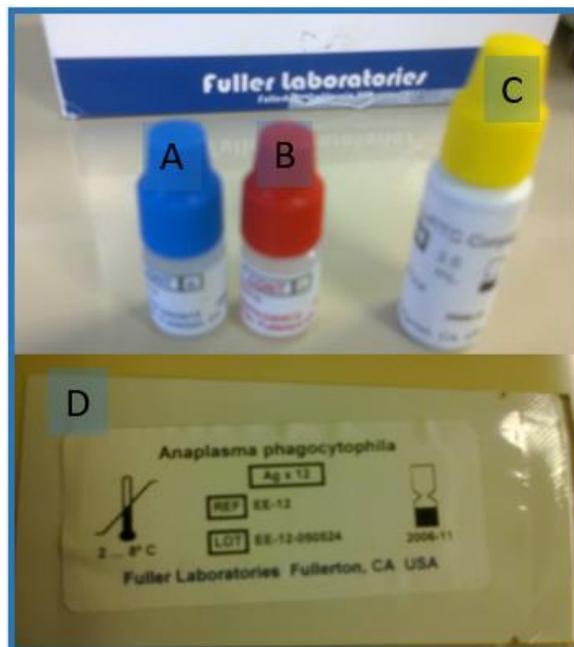


Figura 2: Kit de Reação por Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Anaplasma phagocytophilum* / Anticorpos IgG conjugado felino da marca Fuller Laboratories® utilizado na identificação de amostras de felinos reagentes: A) Controle positivo; B) Controle negativo; C) Conjugado; D) Lâmina impregnada com substrato. Fonte: Arquivo pessoal.

As análises foram realizadas em todas as 60 amostras animais, seguindo as recomendações de uso pelo fabricante para o procedimento. A metodologia da sorologia está descrita abaixo:

- Primeiramente o kit foi retirado do acondicionamento de 2 a 8°C para que todos os reagentes e soro amostral atinjam a temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento da amostra;
- Posteriormente foi preparada uma diluição 1:100 em tampão salino fosfato (PBS) a 0,9% para os soros dos espécimes em cada poço, iniciando a mesma diluição para os controles positivo e negativo. Para o soro positivo encontrado em uma análise prévia, foram preparadas diluições seriais duplas em PBS, iniciando em mesma diluição;
- Para cada soro diluído, foi adicionado 10µl em um poço da lâmina e marcado a localização para sua referência. Para cada amostra diluída executada foi colocado o controle positivo nas respectivas diluições, sendo que um poço foi destinado apenas para controle negativo;

- d) As Lâminas foram incubadas em uma câmara úmida por 30 minutos a $37^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- e) Posteriormente, as lâminas foram removidas da câmara úmida de incubação. As lâminas foram lavadas sob fluxo suave de PBS por 3 vezes. Foi realizado o gotejamento de PBS em cada poço, sendo conservado por 5 minutos nos poços em temperatura ambiente;
- f) A mistura foi homogeneizada e retirado levemente o excesso de PBS das lâminas a fim de se retirar todo conteúdo de PBS dos poços da lâmina;
- g) Em cada poço da lâmina foi adicionada uma gota do conjugado de fluoresceína com anti-IgG felino, a qual contém a albumina bovina e contraste de Evans e posteriormente à mistura as lâminas retornaram para câmara úmida por 30 minutos de incubação a $37^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As lâminas foram colocadas em placa petri devidamente seladas com papel alumínio para criar um ambiente escuro para proteger o conjugado considerado fotossensível;
- h) As lâminas foram novamente lavadas suavemente com PBS por três vezes e retirado o excesso, como descrito acima nos itens e e f;
- i) Para finalizar estas preparações foram adicionadas 3 gotas de selador para montagem das lamínulas sobre as lâminas, sendo removidas as bolhas de ar abaixo das lamínulas cuidadosamente;
- j) Posteriormente em câmara escura e utilizando microscopia de fluorescência as lâminas foram lidas sob aumento em objetiva de 40X, verificando em cada poço a presença de inclusões fluorescentes para *A. phagocytophilum* para confirmar a reação de anticorpos da amostra sendo comparada as reações dos poços controle positivos e a não reação no controle negativo;
- k) Todas as amostras que foram reagentes na diluição 1:100, foram utilizadas para realização de diluições 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600, a fim de se obter os títulos de anticorpos IgG anti- *A. phagocytophilum*. Da mesma forma, tais diluições foram realizadas no controle para que seja comparada com as reações das amostras nas mesmas e respectivas diluições;

Para formação de dados epidemiológicos, as amostras reagentes pela RIFI para *A. phagocytophilum* foram distribuídas descritivamente para confecção das proporções deste agente. As amostras de soro foram consideradas reagentes a partir da titulação 400 (diluição 1:400), considerado o “ponto de corte” (“cut off”) neste presente estudo, pois é considerado o nível limítrofe exigido pela reação da amostra

do paciente para que esta seja considerada reagente positiva, como de acordo com a orientação do fabricante. Com este título reduz-se a sensibilidade do teste, entretanto possibilita aumentar a especificidade para encontrar o determinado agente. Para a padronização foi necessário que a escolha quanto ao “cut-off” fosse obtida de acordo com cada região, visto que se trata de uma parasitose emergente. Tal escolha na presente pesquisa foi baseada em vários trabalhos (WALLS et al., 1999), apesar de trabalhos recentes terem utilizados “cut off” menores que a titulação 400 para soropositividade, possivelmente pelas áreas de abrangência não serem consideradas endêmicas, esta redução do ponto de corte nestes trabalhos possibilitou o aumento da sensibilidade do teste auxiliando encontrar reações positivas dentro da amostra populacional (HAMEL et al., 2012).

4.6- EXTRAÇÃO DO DNA

4.6.1- Sangue total

Após a realização do hemograma, as amostras de sangue total com EDTA foram centrifugadas a $1,26 \times 10^4$ G por cinco minutos em centrífuga RCE®. O plasma foi armazenado para outros fins e a finalidade do procedimento foi a obtenção de um concentrado de células (hemácias, leucócitos e plaquetas). Do sedimentado foram retirados 200 µL do concentrado de células sanguíneas de onde o DNA foi extraído. Este concentrado de células, referente a cada amostra, foi armazenado em microtubo de 500µL e congelado a -20°C.

Antes de iniciar as análises de Reação em Cadeia da Polimerase, foi realizado o processo de extração do DNA do concentrado de células sanguíneas utilizando o kit comercial de extração da marca Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare®. A ilustração do procedimento pode ser visualizada na figura 3.



Figura 3: A) Utilização dos diluentes de lise, lavagem, secagem e de eluição para purificação do DNA da amostra sanguínea; B) Durante os procedimentos a centrífuga foi utilizada para eliminação das impurezas e com a eluição gerar o produto final, o DNA. Fonte: Arquivo pessoal.

O protocolo realizado para extração do DNA das amostras sanguíneas está detalhado abaixo:

Primeiramente para preparação do elution deve-se multiplicar o número de amostras que pretende extrair no momento por 200 μ l, adicionando no final mais 100 μ l. Então abaixo se refere a um exemplo.

- a) O Elution (reagente de eluição) foi colocado para aquecer (70°C) em banho-maria, no volume necessário a cada extração (200 μ l);
- b) Lise das células sanguíneas
 - Preparar a amostra sanguínea: Sedimentar o sangue em centrífuga;
 - Retirar o plasma sobrenadante e descartá-lo;
 - Retirar 200 μ l do concentrado de células incluindo principalmente a capa leucocitária e adicionar em um microtubo, tomando-se cuidado em não retirar o restante de plasma no tubo;
 - Obs.: No presente trabalho as amostras estavam sedimentadas e congeladas, não havendo necessidade de se submeter à etapa de sedimentação descrita anteriormente. Portanto foram retirados diretamente 200 μ L de cada amostra e colocados em cada microtubo e então se seguiu para as próximas etapas.

- Foram adicionados 20 µl de proteinase K em cada amostra de 200 µl no microtubo;
 - Foram adicionados 400 µl de tampão de lise Buffer em cada amostra;
 - Foi aplicado o vortex nesta amostra e esperar após esta homogeneização 10 minutos de descanso em temperatura ambiente;
 - Enquanto isso, realizar a preparação dos filtros: inserir cada filtro no microtubo para se iniciar o processo de purificação;
 - Separar microtubos de 500 µl e marcá-los como fração A e fração B;
- c) Transferência do conteúdo para o filtro
- Após o pulse foi retirado o conteúdo com a pipeta no volume de 700 µL e colocado no microtubo montado com filtro;
 - Posteriormente, colocou-se o microtubo e filtro na microcentrífuga por 13000 RPM durante 1 minuto;
 - Dispensou-se o conteúdo sedimentado no fundo do microtubo, retirando primeiramente o filtro e desprezando o sedimento no compartimento de descarte. Após, repor o filtro no microtubo novamente;
- d) Lavagem
- Foram adicionados 500 µl de lise Buffer (tampão de lise) em cada filtro;
 - Novamente o conteúdo foi colocado por mais 1 minuto na microcentrífuga por 13000 RPM;
 - Dispensou-se o conteúdo sedimentado no fundo do microtubo;
- e) Lavagem e secagem
- Primeiramente para preparar o reagente foram adicionados 24 mL de álcool no recipiente de tampa amarela (WashBuffer) e logo após marcada a tampa do recipiente;
 - Neste momento foram adicionados 500 µl de Wash Buffer no filtro montado;
 - O conteúdo foi centrifugado novamente durante 3 minutos em 13000 RPM;
 - Durante o processo anterior, foi preparado um novo microtubo;
 - Após a centrifugação, descartou-se o resíduo juntamente com o microtubo, pois o filtro irá para o novo microtubo;

f) Eluição

- O Elution mantido em banho-maria foi retirado, este promoveu a dessorção do DNA do filtro para o microtubo, gerando a primeira fração do DNA;
- Foram adicionados 100 µl do Elution em cada filtro e esperar 1 minuto em temperatura ambiente;
- Após foi centrifugado o conteúdo preparado durante 1 minuto;
- Após foi retirado todo conteúdo com a pipeta em 120 µl e transferir ao microtubo marcado como fração A;
- Recolocou-se o filtro no microtubo e logo foi aplicado mais uma vez o Elution (100 µl) no filtro e esperado 1 minuto em temperatura ambiente;
- O material foi colocado na microcentrífuga por 1 minuto e formado o conteúdo para a fração B;
- Após foi retirado todo conteúdo com a pipeta na posição de 120 µl e transferido ao microtubo marcado como fração B. Esta fração foi considerada a mais pura e, portanto, foi utilizada para realização da PCR;

4.7- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da FAV/UnB. Em todas elas foram utilizados controles negativos e positivos para avaliar a ocorrência de contaminação de reagentes e a sensibilidade da reação, respectivamente. Como controle negativo, foi utilizada água destilada e como controle positivo foi utilizado DNA de um animal infectado com o agente em questão (*A. phagocytophilum*, *E.canis* ou *A. platys*). No início da padronização de cada reação foi utilizada além da água a amostra de DNA de um felino hígido como controle negativo para avaliar a especificidade da mesma. A fim de evitar a contaminação com produtos amplificados da PCR (amplicons), a extração, a amplificação e a eletroforese dos produtos amplificados foram realizadas em diferentes setores do laboratório.

4.7.1- PCR do GAPDH: Avaliação da qualidade da extração do DNA

Antes da realização da PCR para identificação dos agentes da família Anaplasmataceae as extrações foram submetidas a PCR para testar a qualidade da extração do DNA, com o intuito de reduzir a quantidade de falsos negativos devido à presença de inibidores da PCR. Para isto foram utilizados os oligonucleotídeos GAPDH-F (5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T-3') e GAPDH-R (5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATGACC-3'), sequências encontradas em todos os mamíferos, que anelam em uma sequência específica do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e resultam em um produto amplificado de 400 pares de base (pb) (BIRKENHEUER et al., 2003).

Para preparação da PCR inicialmente foram realizadas as misturas (Mix) dos componentes necessários para amplificação da sequência desejada. Portanto, para cada amostra foram adicionados os seguintes componentes no mix da PCR: 17 µl de água ultrapura (MilliQ®); 1 µL (10 pmol) de cada oligonucleotídeo, 2,5 µl de tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 0,75 µL (2,5mM) de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,2 µL (0,4mM) de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Invitrogen®), 0,25 µL (0,8U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), posteriormente foi adicionado a cada alíquota de cada amostra 23 µL deste MIX e 2,0µL do DNA da amostra em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação são: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos (40X) de amplificação (desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 2 minutos.

4.7.2- PCR dos agentes da família Anaplasmataceae

Para a identificação de diferentes espécies pertencentes à família Anaplasmataceae foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificação dos agentes *E. canis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum* e as condições das reações foram determinadas experimentalmente.

Os oligonucleotídeos ou primers utilizados na realização da PCR convencional para identificação do agente *Ehrlichia canis* foram propostos por Murphy e colaboradores (1998). Os primers são pertencentes ao gene 16S rRNA, sendo o ECAN-5 o primer Forward (5'-CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A-3') e o HE3 o primer Reverse (5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT-3'). O produto final amplificado ficou em torno de 398 pares de base (pb).

Os oligonucleotídeos utilizados para identificação do agente *Anaplasma platys* foram propostos por Martin e colaboradores (2005). Foram utilizados 4 tipos de primers, pois foram realizadas duas etapas da PCR, considerada Nested PCR. Na primeira etapa foram usados oligonucleotídeos que amplificam grande parte do gene 16S rRNA, sendo os primers 8 Forward (5' AGT TTG ATC ATG GCT CAG 3') e 1448 Reverse (5' CCA TGG CGT GAC GGG CAG TGT G 3'). Na segunda etapa da PCR foram utilizados o oligonucleotídeo PLATYS Forward (5' GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG 3') e outro oligonucleotídeo específico para o gênero *Ehrlichia* sp. EHR16S Reverse (5' TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC 3') que produz um produto de amplificação de 678 pares de base (pb).

Para a realização dos protocolos de preparo e mistura dos componentes necessários na realização da PCR para identificação dos agentes *E. canis* e *A. platys* foi utilizado o kit Recombinant Taq DNA Polymerase da GE Healthcare Life Sciences®. Os componentes contidos no kit foram Cloreto de Magnésio (MgCl₂) e Taq DNA polimerase. Os nucleotídeos dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) foram obtidos do kit GoTaq G2 DNA Polymerase Promega®.

Para identificação do agente *Anaplasma phagocytophilum* pela PCR convencional, foram utilizados os primers MSP3 Forward e MSP3 Reverse, que são considerados fragmentos menores da sequência MSP2 pertencentes ao gene p44. Estes primers utilizados que foram propostos por Zeidner e colaboradores (2000) são mais específicos e formam produtos de amplificação de 334 pares de base (pb). O proposto par de primers é universal e muito eficiente independente do tipo de amostra (por exemplo, sangue animal ou carrapatos), sendo utilizado para amplificação do DNA das amostras de qualquer região geográfica (ZEIDNER et al, 2000). O oligonucleotídeo MSP3 Forward possui a sequência 5'-CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG-3' e o oligonucleotídeo MSP3 Reverse possui a sequência 5'-GCCAGTAACATCATAAGC-3'.

Para realização do protocolo de preparo e mistura dos componentes necessários na realização da PCR para identificação do agente *A. phagocytophilum* foi utilizado o kit GoTaq G2 DNA Polymerase Promega®. Os componentes contidos no kit foram Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), nucleotídeos dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e Taq DNA polimerase.

Após prontas as misturas, os preparos foram colocados no termociclador C1000 Thermocycler Biorad® para formação da PCR, seguindo os ciclos necessários de desnaturação, anelamento e sequenciamento para amplificação de possíveis materiais genéticos dos agentes estudados.

4.8- PREPARO DO GEL DE AGAROSE E CORRIDA EM ELETROFORESE

Esta etapa foi realizada após a PCR, tendo como objetivo analisar através da visualização macroscópica direta a presença de bandas, ou seja, as possíveis formações dos produtos amplificados estudados.

Para averiguação primeiramente foi preparado o Gel de Agarose e a corrida em eletroforese, seguindo o seguinte protocolo:

- Foram utilizadas placas de contensão para o gel de agarose envolvidas com fitas crepe;
- Foi utilizado um gel de agarose na concentração 2% (a concentração obtida depende da quantidade de pares de base - tamanho do amplicon do agente em questão);
- Foram pesados 600 mg (0,6 g) de agarose (Vivantis®) + 30 mL de TEB (Tris, ácido bórico e EDTA) e colocados no molde;
- O material foi diluído completamente na solução e foi evitada a presença de resquícios de cristais;
- Foi adicionada a solução na placa montada;
- Foram necessários aproximadamente 20 minutos para a formação do gel na placa para verificar sua consistência;
- A fita da placa foi removida e foi cortado papel de parafilm;

- Foram adicionados com pipeta 2 μ L (dependendo do teste analisado) do corante azul de bromofenol (0,25%) no parafilm de forma a corresponder à quantidade dos produtos amplificados de cada amostra avaliada;
- Foram aspirados 10 μ L de cada produto amplificado e foram adicionados nos corantes referentes, da mesma forma homogeneizados com a ponteira e os conteúdos retirados aspirando a mesma quantidade. Os conteúdos foram aplicados nos poços e seguindo a ordem a que cada poço representa no gel de agarose;
- Com a pipeta foram adicionados a cada poço 10 μ L da solução anterior, lembrando que o primeiro poço é correspondente ao Ladder;
- Foi colocada a placa com o gel preparado na cuba de eletroforese e acrescentado (completando a cuba) o TEB preparado. Os pólos foram ligados e foram esperados 30 minutos para corrida de eletroforese;
- Posteriormente foi colocado o gel no recipiente de brometo de etídeo (1,5%) em repouso por aproximadamente 20 minutos. A figura 4 representa a aplicação das soluções dos produtos corados com azul de bromofenol nos poços do gel de agarose e remoção do gel do corante brometo de etídeo, posicionando-o na lâmpada de ultravioleta (UV);
- Após o gel foi colocado sobre a lâmpada de UV para visualização das bandas em câmara escura com objetivo de realizar os registros dos resultados.

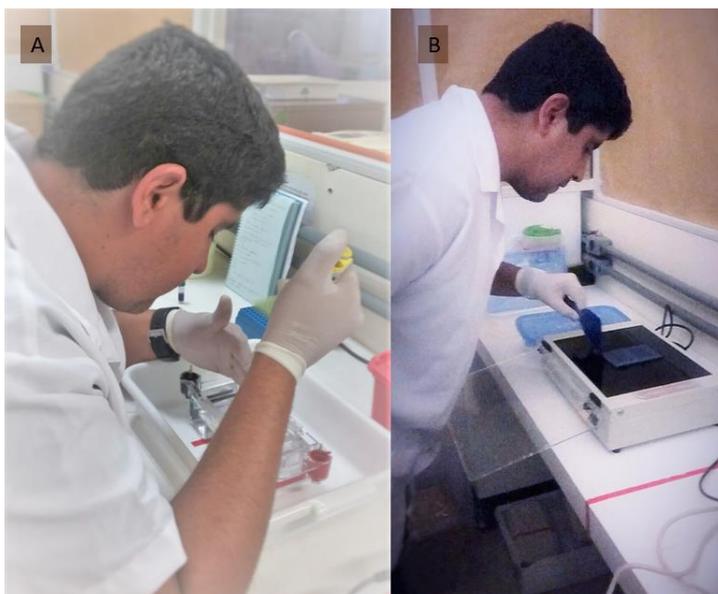


Figura 4: A) Inserindo as soluções dos produtos amplificados devidamente corados em cada poço do gel de agarose; B) Posicionamento do gel sobre a lâmpada Ultravioleta para a realização dos registros dos resultados. Fonte: Arquivo pessoal.

4.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise descritiva dos dados através da obtenção de percentagens para determinar a proporção de amostras de animais positivos para os agentes estudados, seja nas avaliações dos esfregaços sanguíneos, nas amostras reagentes para *A. phagocytophilum* pela Imunofluorescência Indireta e nas amostras positivas para as espécies de *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp nas reações da PCR. A descrição dos resultados permitiu a realização do estudo epidemiológico e obtenção das proporções clínico-patológicas para verificação das frequências dos agentes da família Anaplasmataceae estudados e suas respectivas alterações clínico-laboratoriais nos felinos domésticos do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. As análises descritivas realizadas estão descritas abaixo.

4.9.1 Dados epidemiológicos

Foi utilizada a estatística descritiva pela análise quantitativa proporcional para a formação dos dados. Os cálculos de probabilidade foram baseados no espaço amostral (Ω) de 60 amostras de felinos domésticos da região de Campos dos Goytacazes, RJ.

- Proporção total de amostras com corpúsculos de inclusão (n e %);
- Proporção de amostras com corpúsculos de inclusão para cada célula (n e %);
 - Monócito (n e %);
 - Plaqueta (n e %);
 - Neutrófilo (n e %);
- Proporção de amostras positivas na PCR para agentes Anaplasmataceae;
- Proporção de amostras positivas na PCR para *E. canis* (n e %);
- Proporção de amostras positivas na PCR para *A. platys* (n e %);

- Proporção de amostras positivas na PCR para *A. phagocytophilum* (n e %);
- Proporção de amostras reagentes pela RIFI para *A. phagocytophilum* (n e %);
- Confrontar as amostras positivas na PCR para agentes Anaplasmataceae com os dados de corpúsculos de inclusão;
- Confrontar as amostras positivas na PCR para *Anaplasma phagocytophilum* com os dados de corpúsculos de inclusão em neutrófilos;
- Confrontar as amostras positivas na PCR para *Anaplasma platys* com os dados de corpúsculos de inclusão em plaquetas;
- Confrontar as amostras positivas na PCR para *Ehrlichia canis* com os dados de corpúsculos de inclusão em monócitos;
- Confrontar as amostras positivas na PCR para *Ehrlichia canis* com os dados de corpúsculos de inclusão em plaquetas;
- Confrontar as amostras reagentes pela RIFI para *Anaplasma phagocytophilum* com os dados de corpúsculos de inclusão;
- Confrontar as amostras reagentes pela RIFI para *Anaplasma phagocytophilum* com amostras positivas na PCR para *A. phagocytophilum*;
- Confrontar as amostras reagentes pela RIFI para *Anaplasma phagocytophilum* com amostras positivas na PCR para *A. platys*.
- Taxa (n e %) de coinfeção:
 - *E. canis* com *A. platys*;
 - *E. canis* com *A. phagocytophilum*;
 - *A. platys* com *A. phagocytophilum*;

4.9.2- Dados Clínico-patológicos

Foram utilizados apenas os dados dos animais positivos para algum agente Anaplasmataceae na PCR, sendo realizada estatística descritiva por análise quantitativa proporcional para obtenção das proporções de alterações clínicas e laboratoriais em animais com alguma determinada infecção para agentes da família Anaplasmataceae.

- Verificar a proporção de alterações clínicas mais frequentes (n e %) em animais positivos para Anaplasmataceae;

- Verificar a proporção de alterações clínicas mais frequentes (n e %) em animais positivos para *E. canis*;
- Verificar a proporção de alterações clínicas mais frequentes (n e %) em animais positivos para *A. platys*;
- Verificar a proporção de alterações clínicas mais frequentes (n e %) em animais positivos para *A. phagocytophilum*;
- Verificar a proporção de alterações laboratoriais mais frequentes (n e %) em animais positivos para Anaplasmataceae:
- Verificar a proporção de alterações laboratoriais mais frequentes (n e %) em animais positivos para *E. canis*;
- Verificar a proporção de alterações laboratoriais mais frequentes (n e %) em animais positivos para *A. platys*;
- Verificar a proporção de alterações laboratoriais mais frequentes (n e %) em animais positivos para *A. phagocytophilum*.

4.9.3- Correlações entre as alterações laboratoriais e animais infectados com agentes Anaplasmataceae

Com a finalidade de encontrar associações entre as alterações laboratoriais e a presença de infecção (amostras positivas na PCR para agentes Anaplasmataceae) foi realizado o teste não-paramétrico Qui-quadrado de Pearson por independência para demonstrar se os graus dos parâmetros (variável y_i) normal, grau de lesão inicial e grau de lesão avançado ocorrem de forma independente ou dependente dos animais negativos assintomáticos (controle), suspeitos negativos e suspeitos positivos para agentes Anaplasmataceae (variável x_i). A análise estatística foi realizada utilizando o programa Minitab applicative (versão 15.1.1.0.2007). As tabelas 3, 4 e 5, no tópico de resultados e discussão demonstram os testes para estas duas variáveis, sendo que os parâmetros da variável y_i de cada tabela são referentes aos dados globulinas, albumina e trombocitopenia, respectivamente. Os testes Qui-quadrado para avaliação destes dados laboratoriais foram realizados para formação dos Qui-quadrados

calculados (χ^2c) e assim comparados com o Qui-quadrado tabelado (χ^2t) na probabilidade de 5%. Segue abaixo a fórmula para Qui-quadrado por independência:

$$\chi^2c = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (fo_{ij} - fe_{ij})^2 / fe_{ij}$$

Sendo: Fo= frequência observada;

Fe= frequência esperada.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos as doenças transmitidas por carrapatos em felinos domésticos têm surgido de forma inesperada, ou seja, emergente. Isso tem proporcionado aumento da distribuição destas doenças e da mesma forma em suas prevalências globais. As características ambientais, os fatores comportamentais humanos e demográficos (como viagem com animais domésticos, mudanças nas atividades sociais e de lazer) juntamente com os impactos diretos das mudanças climáticas, da ampla distribuição geográfica e capacidade vetorial dos artrópodes têm contribuído nas variações epidemiológicas destas doenças transmitidas por artrópodes (BEUGNET; MARIÉ, 2009; BANETH et al., 2012; MAIA et al., 2014).

As proporções das frequências para formação dos dados epidemiológicos a partir da avaliação de corpúsculos de inclusão, do teste de Reação de Imunofluorescência Indireta e da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) foram distribuídas através de gráficos para evidenciar as taxas na amostra populacional, desta forma formando estes dados. Vale ressaltar que os animais comprovadamente positivos em PCR serão descritos como animais com a infecção instalada, pois é considerado um teste de alta especificidade e sensibilidade (BREITSCHWERDT et al., 2002; AGUIRRE et al., 2004; LAPPIN et al., 2004). Desta forma, para confrontar os testes de diagnóstico foi utilizada como base a proporção de amostras positivas pela PCR e quando verificadas as proporções dos outros tipos de diagnóstico como avaliação hematoscópica de corpúsculos de inclusão e o teste de Imunofluorescência Indireta, foram definidas a especificidade e sensibilidade destes métodos de diagnóstico.

5.1- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS COM CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO

Inicialmente os dados epidemiológicos foram distribuídos através das avaliações laboratoriais de rotina como a avaliação hematoscópica de corpúsculos de inclusão. Os corpúsculos de inclusão são formas reprodutivas dos agentes Anaplasmataceae em células sanguíneas ou em plaquetas (DUMLER et al., 2001;

TARELLO, 2005; ZOBBA et al., 2015). Considerado por muitos um teste de baixa sensibilidade, por ser de difícil identificação em microscopia óptica, também é considerado um teste de baixa especificidade devido a outras formas que poderiam ocasionar uma falsa positividade pois muitas das vezes são confundidos com artefatos na hematoscopia (LITTLE, 2010). Primeiramente, foi analisada descritivamente a proporção de amostras positivas por corpúsculos de inclusão na avaliação hematoscópica do esfregaço sanguíneo. Foi encontrado um total de 18 amostras de animais (30%), de 60 animais, com a presença de corpúsculo de inclusão, como pode ser verificado na figura 5 abaixo. Dados semelhantes podem ser visualizados em outros trabalhos como no nordeste dos Estados Unidos, na qual encontraram uma frequência de 19% de animais positivos pela visualização de mórulas de Anaplasmataceae pela hematoscopia (SAVIDGE et al., 2015).

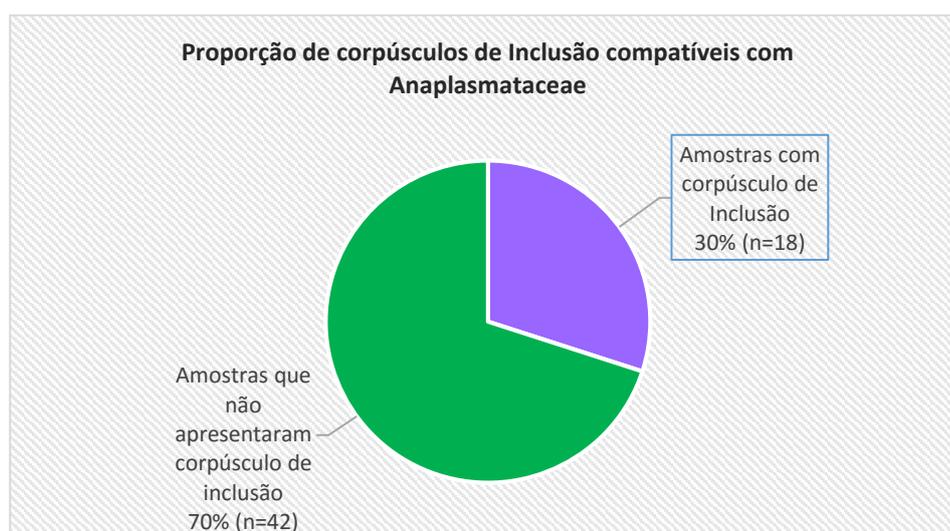


Figura 5: Proporção de corpúsculos de inclusão dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Foram verificados que, das 60 amostras dos felinos, 17 amostras (28,3%) possuíam corpúsculos de inclusão visualizados apenas em plaquetas, 2 amostras (3,33%) possuíam corpúsculos de inclusão visualizados apenas em neutrófilos, 1 (1,67%) amostra apresentou corpúsculos de inclusão visualizados tanto em plaqueta quanto neutrófilo e nenhuma amostra possuiu corpúsculos de inclusão em monócitos. Na figura 6 podem ser visualizadas as fotografias obtidas de corpúsculos de inclusão durante a pesquisa de hemoparasitas pela microscopia óptica.

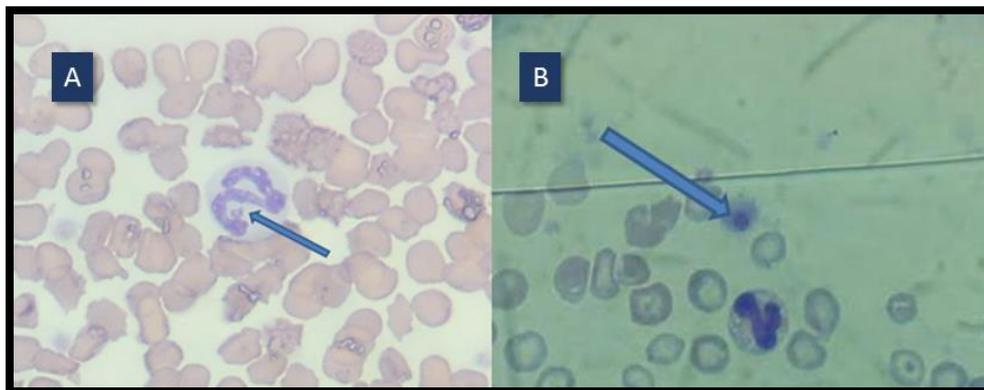


Figura 6: A- Corpúsculo de inclusão encontrado em neutrófilo segmentado (seta) durante a pesquisa de hemoparasitas pela microscopia óptica em objetiva de aumento 100X; B- Corpúsculo de inclusão encontrado em plaqueta (seta) durante a pesquisa de hemoparasitas pela microscopia óptica em objetiva de aumento 100X. Fonte: Arquivo pessoal.

A presença de corpúsculos de inclusão em células específicas pode ser de grande relevância quando há suspeita de determinada doença riquetsial. Dependendo do agente em questão, este pode possuir um tropismo maior para um determinado tipo celular (DUMLER et al., 2001; ZOBBA et al., 2015). No entanto, este tipo de diagnóstico é relativo pois o agente pode parasitar diferentes tipos celulares. Por esta razão foram verificadas as proporções de corpúsculo de inclusão para cada célula, como verificado na figura 7.

Em relação aos corpúsculos de inclusão em neutrófilos, um trabalho semelhante realizado na Itália por Tarello (2005) relata a presença de corpúsculos de inclusão em neutrófilos em 6% dos animais. Uma frequência mais ampla pode ser verificada no trabalho realizado por Savidge e colaboradores que encontraram 19% dos felinos com corpúsculos de inclusão em neutrófilos no nordeste dos Estados Unidos. Em trabalho prévio em Campos dos Goytacazes, Correa e colaboradores (2011) revelaram que 9,89% das amostras apresentaram mórulas em plaquetas, diferentemente do atual trabalho. Infelizmente, muitos trabalhos relatam a dificuldade de encontrar corpúsculos de inclusão nos animais infectados principalmente com *E.canis*, mesmo na forma grave da doença (HARRUS; WANER, 2011). Entretanto, em outros relatos, as mórulas têm sido detectadas em monócitos e linfócitos em gatos naturalmente infectados nos Estados Unidos, Quênia, França, Brasil e na Tailândia (LAPPIN; BREITSCHWERDT, 2012).

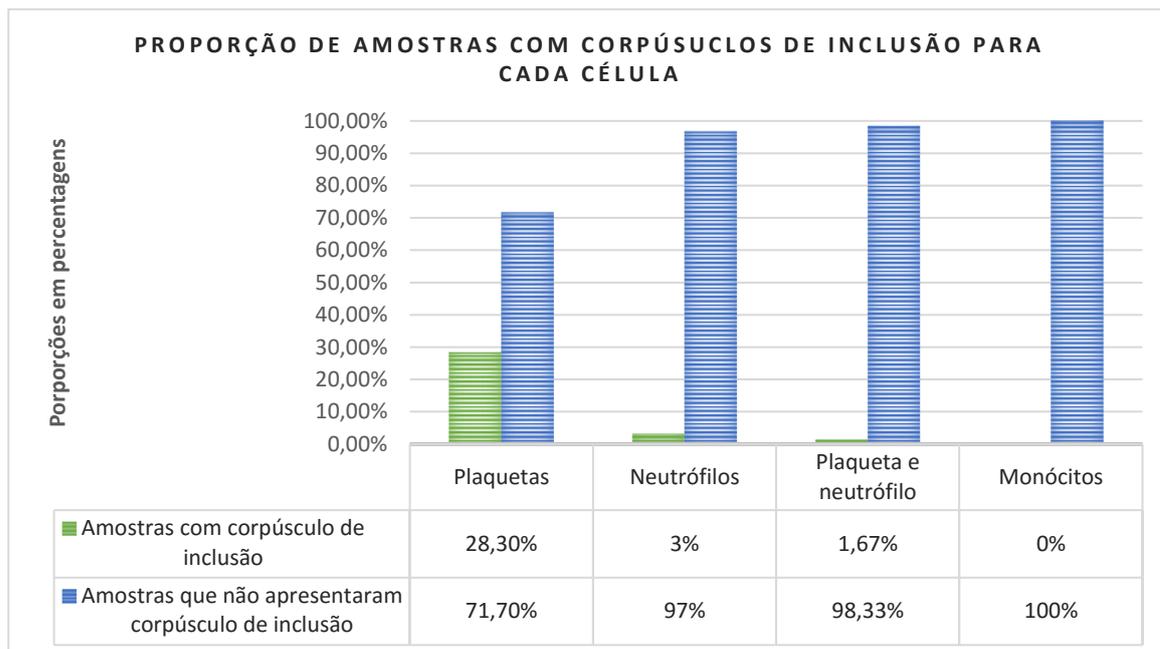


Figura 7: Proporção de amostras com corpúsculos de inclusão em cada célula dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.2- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS A PCR PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE

De fato, os dados epidemiológicos são realizados com testes com alta especificidade e sensibilidade como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pois quando amplificado o DNA (ácido desoxirribonucleico) do agente estudado se confirma a presença do agente na amostra animal, portanto determinando a infecção no indivíduo e assim a doença na amostra populacional (AGUIRRE et al., 2004). Esta importância se iniciou a partir da reorganização dos gêneros e formação da família Anaplasmataceae através da análise da sequência do gene 16S RNA ribossomal promovida por Dumler e colaboradores (2001), desde então várias construções de oligonucleotídeos ou primers estão sendo utilizadas para amplificação do DNA dos agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

No presente estudo os dados foram distribuídos para determinação da proporção de amostras positivas para agentes da família Anaplasmataceae confirmadas pela PCR, ou seja, ambas *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. Foi verificado que 20 (33,3%) das amostras de animais possuíam positividade para pelo menos

algum agente da família (figura 8). Amplas frequências também foram verificadas em por Spada e colaboradores (2014) no norte da Itália, na qual encontraram uma alta frequência de 48,9% de animais positivos para algum agente da família. Foi encontrada uma alta frequência no trabalho elaborado por Aguirre e colaboradores (2004) na região central da Espanha, sendo uma proporção de 17,9% de animais com a presença de agentes. No trabalho realizado por Sasaki e colaboradores (2012) no Japão foi encontrada uma proporção de 11,1% de amostras de felinos positivos para Anaplasmataceae.

Frequências menores em amostras positivas para Anaplasmataceae podem ser verificadas em outros trabalhos. O trabalho realizado por Maia e colaboradores (2014) no Sul de Portugal verificou uma frequência de 5,4%, bem similar ao trabalho realizado por Hegarty e colaboradores (2015), que foi de 3,2%, trabalho este realizado no laboratório de diagnósticos de doenças transmitidas por vetores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Carolina do Norte, na qual as amostras submetidas neste laboratório foram oriundas de vários locais dos Estados Unidos. No sul da Alemanha, Bergmann e colaboradores (2015) encontraram uma frequência de apenas 0,4%, também sendo baixa quando comparada ao atual trabalho. André e colaboradores (2015) na região Centro-oeste do Brasil, na cidade de Campo Grande do estado de Mato Grosso do Sul, encontraram uma frequência de 8,5%.

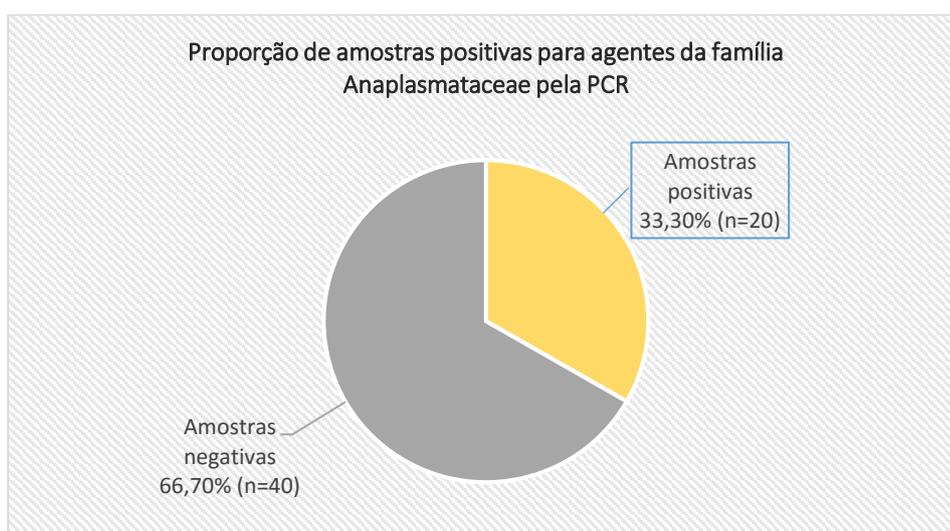


Figura 8: Proporção de amostras positivas na PCR para agentes da família Anaplasmataceae dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.3- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *E. canis*

A proporção de amostras positivas para *E. canis* foi de 5 (8,33%) em 60 amostras de animais (figura 9). Resultado muito similar foi verificado por Braga e colaboradores (2014) em Cuiabá, Mato Grosso, no Brasil, no qual 9,4% de amostras positivas foram observadas. Frequências menores podem ser verificadas em alguns outros trabalhos. Em São Luís, no Maranhão, foi verificada uma proporção de 0,5% de amostras infectadas por este agente (BRAGA et al., 2012) e em Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, a proporção foi de 0,66% (ANDRÉ et al., 2015).

São encontradas também frequências maiores na população de felinos, identificadas através da realização da PCR para identificação do *E. canis* por Oliveira e colaboradores (2009) em Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil, nos quais encontraram uma proporção de 20% de animais positivos para este agente. Aguirre e colaboradores (2004) na região central da Espanha encontraram uma proporção de 17,9% de amostras positivas.

É interessante relatar que a baixa percentagem de animais positivos para este agente verificada no presente estudo, da mesma forma como em outros trabalhos, possivelmente é explicada pelo fato de que os felinos domésticos são mais resistentes às infecções promovidas pelo agente *E. canis* quando comparados aos cães, pois a interação entre estes animais e o mesmo vetor, no caso o carrapato, é diferente. Obviamente que isso se refere ao comportamento do gato em remover os carrapatos, e isso possibilita a redução da taxa de inoculação do agente pelo vetor (KIDD, BREITSCHWERDT, 2003). Por esta razão muitos trabalhos revelam que é incomum a infecção por *E. canis* nos felinos (BRAGA et al., 2012).

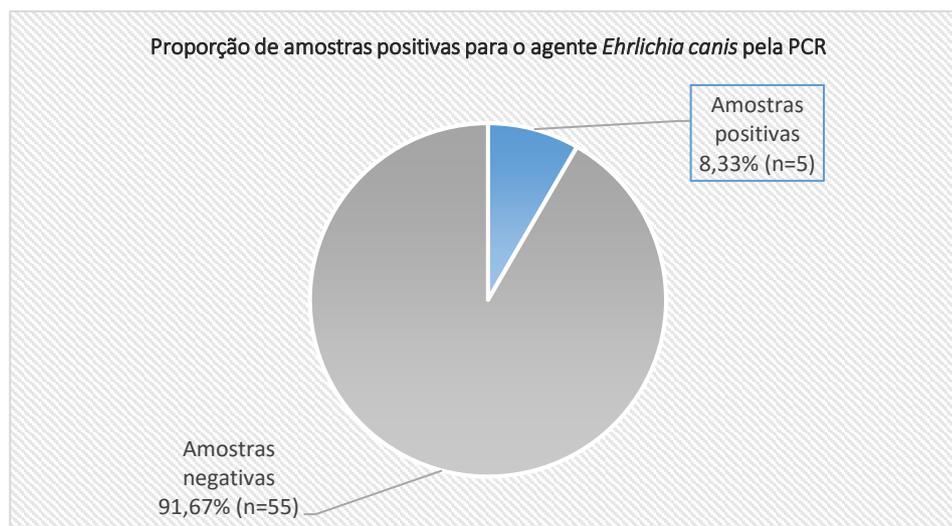


Figura 9: Proporção de amostras positivas para o agente *Ehrlichia canis* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.4- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *A. platys*

A proporção de amostras positivas para o agente *A. platys* foi de 12 animais (20%), das 60 amostras de animais (figura 10). Zobba e colaboradores (2015) em Sassari, Itália, identificaram 31,11% de felinos positivos para *A. platys*. Correa e colaboradores (2011) em Campos dos Goytacazes encontraram uma frequência de 13,19%. Muitos outros trabalhos encontrados em outras espécies, principalmente em cães, relatam que a parasitemia é muito maior quando comparados aos gatos (INOKUMA et al. 2000; ALVES et al., 2005; DOYLE et al. 2005). Outro trabalho realizado no Brasil, foi a identificação deste agente em um paciente felino, do estado do Pernambuco, na qual demonstram que a identificação deste agente acontece raramente (LIMA et al., 2010), em contraste com o atual estudo.

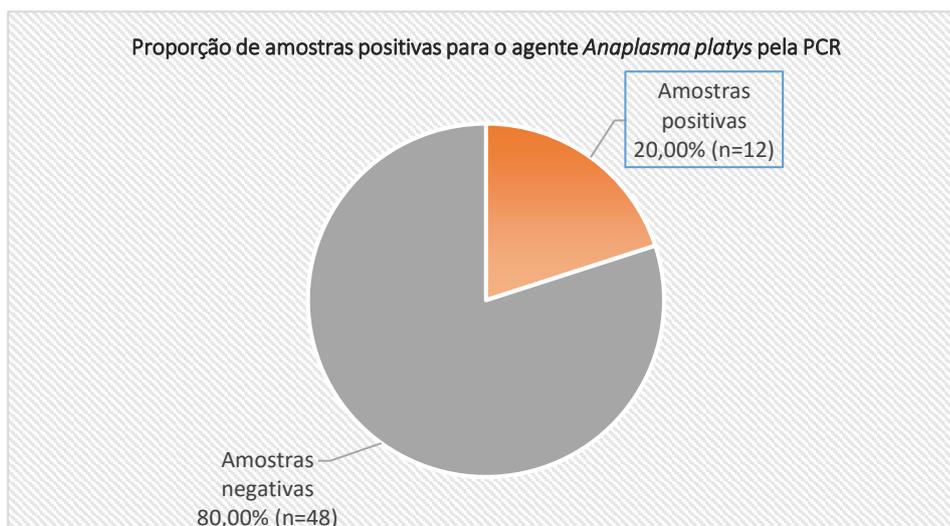


Figura 10: Proporção de amostras positivas para o agente *Anaplasma platys* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.5- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *A. phagocytophilum*

Estes dados foram considerados inéditos para a espécie felina no município de Campos dos Goytacazes. Foi verificada a presença de animais infectados com *Anaplasma phagocytophilum*, agente este conhecido por causar a Anaplasmoze granulocítica em animais, inclusive felinos e humanos, sendo de extrema relevância por ser considerada uma doença antrozoonótica (DUMLER et al., 2007; BAKKEN; DUMLER, 2008; LITTLE, 2010). Por conseguinte, a proporção de amostras positivas para *A. phagocytophilum* foi de 6 animais (10%) dentro das 60 amostras de animais, (figura 11).

Spada e colaboradores (2014), no norte da Itália, encontraram uma ampla frequência de 17,7% de felinos positivos para *A. phagocytophilum*. Entretanto, como relatado na maioria dos trabalhos, a frequência encontrada para *A. phagocytophilum* é geralmente baixa em amostras populacionais de felinos. Savidge e colaboradores (2015) encontraram 0,92% de amostras positivas para este agente em felinos domésticos no nordeste dos Estados Unidos. No sul da Alemanha, Bergmann e colaboradores (2015) encontraram uma proporção de 0,42% de felinos positivos na PCR para este agente. Hegarty e colaboradores (2015) encontraram 2,45% de

amostras positivas, na qual foram submetidas à análise no laboratório de diagnósticos de doenças transmitidas por vetores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Carolina do Norte, amostras positivas para este agente procedentes de vários locais dos Estados Unidos.

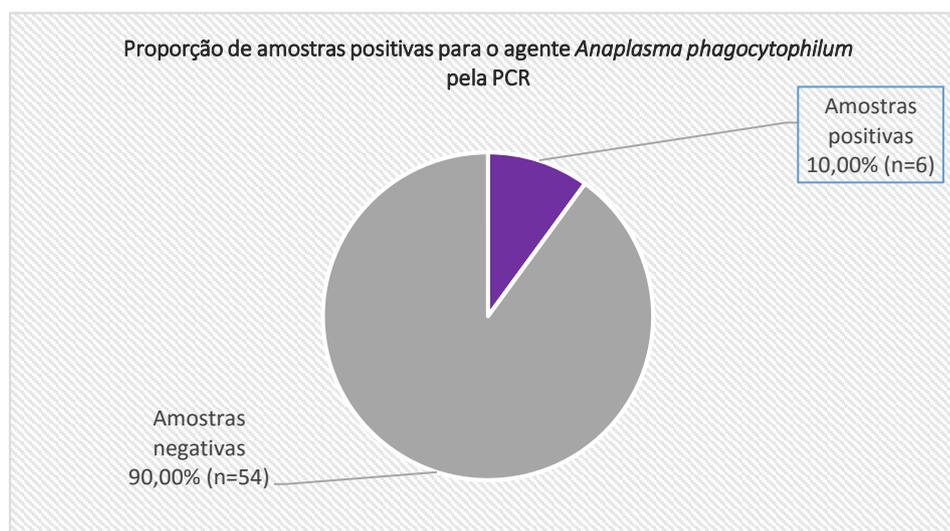


Figura 11: Proporção de amostras positivas para o agente *Anaplasma phagocytophilum* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.6- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO

Certamente que o diagnóstico de corpúsculos de inclusão pela investigação hematoscópica é impreciso, pela necessidade de ter um técnico laboratorial altamente treinado para a evidenciação destas formas na microscopia. Muitas vezes, a notificação de algum agente Anaplasmataceae por este tipo de diagnóstico não ocorre de forma coerente no laboratório de rotina, sendo considerado um diagnóstico de baixa sensibilidade. Da mesma forma, pode-se pensar que muitos artefatos verificados na microscopia durante o exame do esfregaço sanguíneo podem confundir e são capazes de promover um diagnóstico inadequado, sendo em algumas vezes confundidos com as formas compatíveis com corpúsculos de inclusão, e por esta razão também é considerado um teste com baixa especificidade (DAWSON et al., 2005; LITTLE, 2010). Por este motivo foi necessário confrontar os dados dos animais comprovadamente infectados, ou seja, positivos para PCR, com os dados de

corpúsculos de inclusão, assim como confrontar com a presença de corpúsculos de inclusão nas células específicas. Desta forma, verificou-se a sensibilidade e especificidade do diagnóstico hemotoscópico de corpúsculos de inclusão compatíveis com formas de agentes Anaplasmataceae.

Para tal investigação, inicialmente foram confrontados os dados das amostras positivas dos felinos para agentes Anaplasmataceae através da PCR com os dados das amostras em que foram encontrados corpúsculos de inclusão. A principal hipótese foi verificar quantas amostras positivas na PCR tiveram a presença de corpúsculos de inclusão. Estes dados são demonstrados na figura 12, na qual é demonstrado dentre os 20 animais positivos para Anaplasmataceae na PCR, concomitantemente 3 animais (15%) apresentaram corpúsculos de inclusão. Tais dados demonstram, dentre as amostras comprovadamente infectadas na PCR, que em poucas amostras foram evidenciados corpúsculos de inclusão na hematoscopia, presumindo que o diagnóstico para avaliação dos corpúsculos de inclusão é de baixa sensibilidade, assim como corroborado por Little (2010), que explica que a maioria das mórulas não se apresenta em amostras de animais realmente infectados.

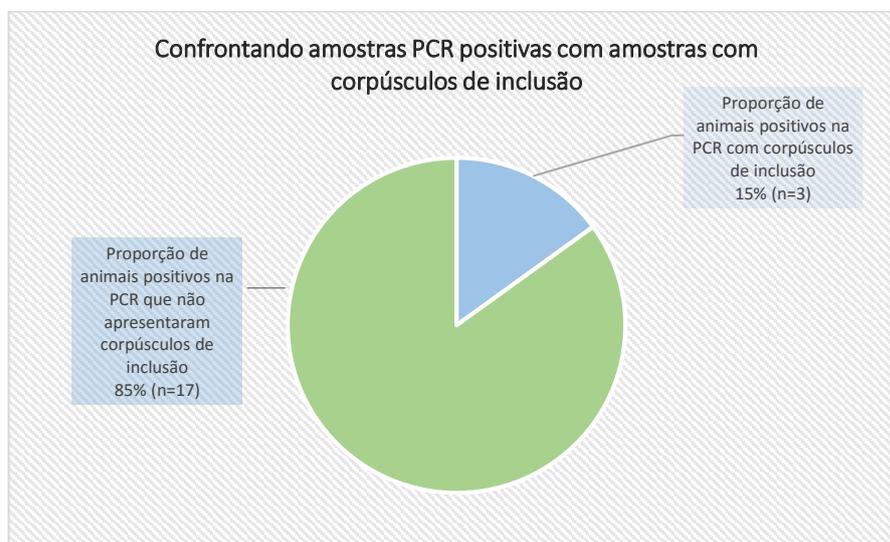


Figura 12: Proporção de amostras positivas na PCR que apresentaram corpúsculos de inclusão na hematoscopia.

5.7- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *Anaplasma phagocytophilum* COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM NEUTRÓFILOS

Seguindo a mesma argumentação, foram avaliadas também as proporções de amostras positivas na PCR para cada agente específico com a presença de corpúsculos de inclusão em suas respectivas células em que estes agentes parasitam e se reproduzem. Inicialmente foi avaliada a proporção de amostras positivas para *A. phagocytophilum* que possuíram corpúsculos de inclusão em neutrófilos, e foi verificada uma proporção de 16,67%, pois de 6 amostras de animais positivos na PCR para este agente apenas 1 apresentou corpúsculo de inclusão em neutrófilo. Este resultado pode ser verificado na figura 13.

Savidge e colaboradores (2015) explanam em sua pesquisa que apenas a presença de corpúsculos de inclusão em neutrófilos corrobora com a positividade do agente. Entretanto, no atual trabalho, quando os resultados verificados na PCR para este agente são confrontados com esta avaliação hematoscópica, verifica-se que houve uma pequena proporção, confirmando que o teste hematoscópico é de baixa sensibilidade. No entanto, um trabalho realizado por Heikkilä e colaboradores (2010), em um relato de caso de um atendimento de um felino no Hospital Veterinário da Universidade de Helsinki na Finlândia, o diagnóstico se deu através da visualização da mórula intracitoplasmática em neutrófilos. Em mesma pesquisa, posteriormente, foi realizada a PCR da amostra sanguínea para confirmação do agente *A. phagocytophilum*, e foi comprovado que a amostra, realmente, era positiva para este agente. Portanto, entende-se que apesar de ser um teste de baixa sensibilidade, quando encontradas formas compatíveis com corpúsculos de inclusão em neutrófilos possivelmente estas amostras são consideradas positivas para este agente, mas para confirmar isso é necessário realizar a PCR.

Deve-se lembrar que o agente *A. phagocytophilum* se reproduz em neutrófilos formando corpúsculos de inclusão, possuindo um maior tropismo por estas células, sendo assim a presença de corpúsculos de inclusão em neutrófilos pode ser considerada um diagnóstico para este agente (TARELLO, 2005). Posteriormente foi verificada a especificidade entre a avaliação de corpúsculos de inclusão em neutrófilos na hematoscopia e o teste da PCR para *A. phagocytophilum*. Para isso, foram

verificadas quantas amostras positivas para corpúsculo de inclusão em neutrófilos também foram positivas na PCR para *A. phagocytophilum*. Muitos autores defendem a ideia de que a presença de corpúsculos ou mórulas em neutrófilos configura a infecção por este agente no paciente felino e ainda incluem que a identificação de mórulas em neutrófilos seja considerada um achado plausível da infecção pelo agente *A. phagocytophilum*, pois estes mesmos autores confirmaram na PCR a presença deste agente (TARELLO, 2005; SAVIDGE et al., 2015). No presente estudo foram encontradas 3 amostras com corpúsculos de inclusão em neutrófilos, no entanto quando estas mesmas amostras foram colocadas a prova na PCR para confirmação do agente, apenas 1 amostra foi positiva, concluindo-se que 2 animais realmente não foram diagnosticados precisamente e que a avaliação hematoscópica não seja específica comparada ao diagnóstico pela PCR. Isso pode ser justificado, pois a presença de corpúsculo de Döhle ou a presença de cromatina sexual em neutrófilos podem ser confundidos e devem ser cuidadosamente diferenciados de inclusões intracitoplasmáticas como mórulas ou corpúsculos do agente (SAVIDGE et al., 2015).

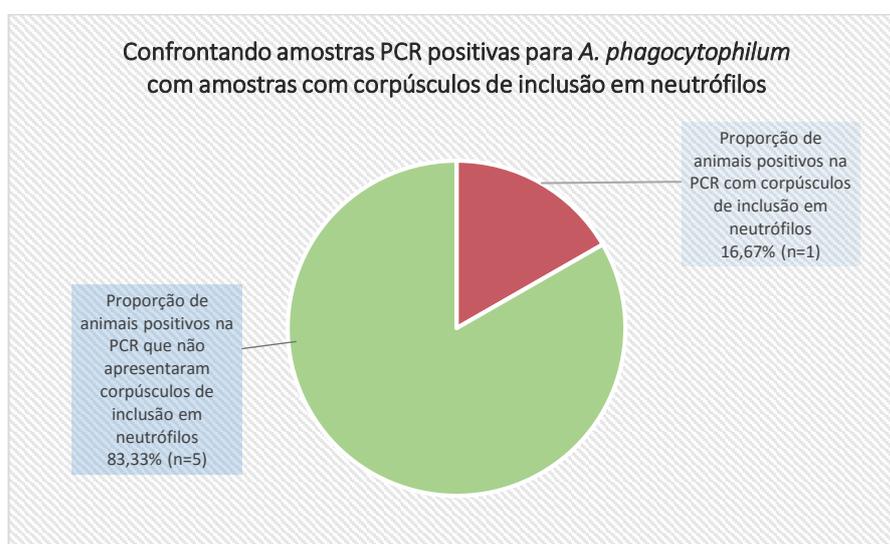


Figura 13: Proporção de amostras positivas na PCR para *A. phagocytophilum* que apresentaram corpúsculos de inclusão em neutrófilos na hematoscopia.

5.8- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *Anaplasma platys* COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM PLAQUETAS

Ao verificar a proporção de amostras positivas na PCR para *A. platys* que possuíram corpúsculos de inclusão em plaquetas, foi constatada uma proporção de 8,33%, na qual das 12 amostras positivas na PCR para este agente apenas 1 apresentou corpúsculo de inclusão em plaquetas. Estes dados podem ser verificados na figura 14. De fato, muitas amostras positivas para este agente relatam a presença de corpúsculos de inclusões em plaquetas semelhantes a *A. platys* (HARVEY, 2012). Como apenas 1 amostra foi identificada a inclusão em plaquetas, isso sugere que a visualização da inclusão é difícil. Little (2010) explica que as mórulas de *A. platys* podem ser encontradas em plaquetas, mas em alguns casos a visualização pode ser dificultada pela indistinção com grânulos plaquetários. E possivelmente, por esta dificuldade a confirmação deste agente torna-se prejudicada, confirmando que a sensibilidade no diagnóstico pela presença de mórulas é baixa. É interessante relatar também que devido à natureza cíclica da doença, encontrar a inclusão no interior das plaquetas de animais doentes não é uma tarefa fácil, e na maioria das vezes é um achado acidental. Isso também pode ser justificado quando o paciente avaliado possui uma trombocitopenia (diminuição da contagem de plaquetas) durante a infecção e, conseqüentemente, há a redução no número de microrganismos presentes nas plaquetas. A baixa frequência de parasitas no esfregaço de sangue faz com que o método não seja tão preciso, especialmente durante a fase trombocitopênica (CORREA et al., 2011).

O agente *A. platys* se reproduz em plaquetas formando corpúsculos de inclusão, possuindo um maior tropismo por estes fragmentos celulares, sendo assim a presença de corpúsculos de inclusão pode ser considerada um diagnóstico para este agente (SANTAREM et al., 2005). Logo após foi verificada a especificidade entre a avaliação de corpúsculos de inclusão em plaquetas na hematoscopia e o teste da PCR para *A. platys*. Para isso, foi verificado que o número de amostras que foram positivas para corpúsculo de inclusão em plaquetas também foram positivas na PCR para *A. platys*. No presente trabalho foram encontradas 17 amostras positivas na visualização de corpúsculos de inclusão e apenas 1 amostra foi confirmada na PCR

para este agente, configurando também que o diagnóstico pela avaliação hematoscópica seja de baixa especificidade. Há uma grande dificuldade no diagnóstico de corpúsculos ou mórulas em plaquetas, pois estes fragmentos celulares geralmente possuem granulações semelhantes a estas formas, granulações formadas no citoplasma de megacariócitos antes da formação das plaquetas (LITTLE, 2010).

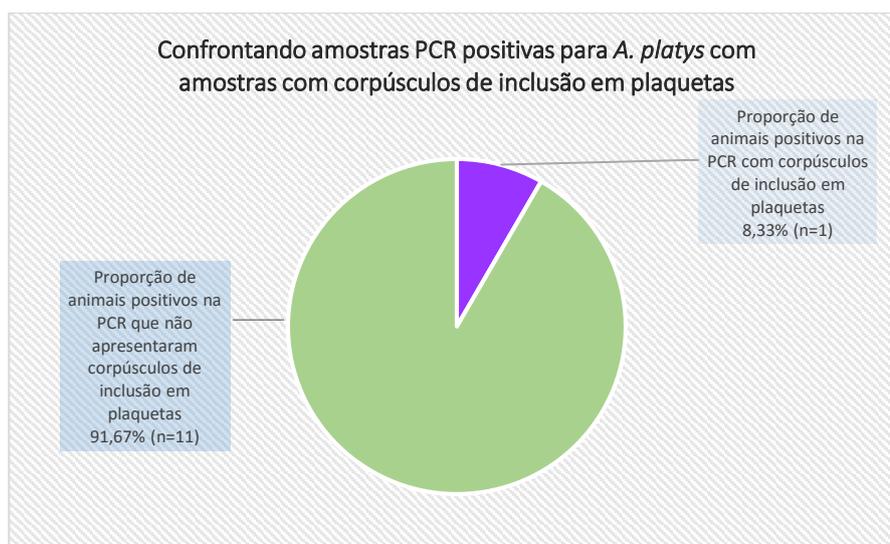


Figura 14: Proporção de amostras positivas na PCR para *A. platys* que apresentaram corpúsculos de inclusão em plaquetas na hematoscopia.

5.9- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *Ehrlichia canis* COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM MONÓCITOS

Quando foi verificado que dentre as amostras tinham aquelas positivas para *E. canis* na PCR pensava-se também encontrar corpúsculos de inclusão na avaliação hematoscópica em monócitos nestas mesmas amostras sanguíneas. O agente *E. canis* geralmente parasita os monócitos devido ao seu tropismo celular (LAPPIN; BREITSCWERDT, 2012). Contudo, no presente estudo não foi evidenciado dentre as amostras positivas na PCR para *E. canis* a presença de corpúsculos de inclusão nestas células em microscopia.

5.10- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *Ehrlichia canis* COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO EM PLAQUETAS

Sabendo que as plaquetas são capazes de albergar as formas reprodutivas deste agente (ZOBBA et al., 2015), foi verificado que dentre as amostras positivas na PCR para *E. canis* 20% (1 amostra de 5 positivos na PCR para este agente) apresentavam corpúsculos de inclusão em plaquetas. Como relatado por Mylonakis e colaboradores (2003), as plaquetas podem ser parasitadas tanto por *E. canis* quanto por *A. platys*, e isso justifica a presença de corpúsculo de inclusão em plaquetas na amostra comprovadamente infectada por *E. canis*, como no presente estudo. Almosny (1998) ainda faz esta mesma afirmação, que mórulas de *E. canis* podem ser observadas em plaquetas, podendo ser confundida com *A. platys* baseando-se na identificação morfológica do agente na célula parasitada. D'Agnone (2006) observou a presença de *E. canis* em plaquetas em duas amostras caninas por meio da PCR, assim como Sousa (2006) que também observou mórulas de *E. canis* em plaquetas de dois cães. Semelhantemente, Ramos e colaboradores (2009) através da PCR observaram que de quatro cães com mórulas em plaquetas, três eram *E. canis* e apenas uma amostra era *A. platys*.

O agente *E. canis* se reproduz tanto em monócitos quanto em plaquetas formando corpúsculos de inclusão, possuindo um maior tropismo para ambos os tipos celulares, no entanto, o diagnóstico deste agente pela avaliação de corpúsculos de inclusão em plaquetas é imprecisa, já que o *A. platys* também pode parasitá-las (RAMOS et al., 2009). Desta forma, também foi verificada a especificidade entre a avaliação de corpúsculos de inclusão em plaquetas na hematoscopia e o teste da PCR para *E. canis*. Para isso, foi verificado quantas amostras positivas para corpúsculo de inclusão em plaquetas também foram positivas na PCR para *E. canis*. Das 17 amostras em que foram encontrados corpúsculos de inclusão em plaquetas, 1 amostra foi positiva na PCR para *E. canis*. Isso demonstra que é um teste de baixa especificidade para confirmação que as presenças de corpúsculos em plaquetas sejam de *E. canis*, já que *A. platys* pode parasitá-las, como relatado por Almosny (1998) e em alguns trabalhos (D'AGNONE; 2006; RAMOS et al., 2009).

5.11- PROPORÇÃO DE AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA *A. phagocytophilum*

Além da evidência epidemiológica realizada através da exposição de amostras infectadas, ou seja, amostras positivas em PCR, para formação dos dados, também foi realizado o estudo sorológico epidemiológico pela investigação de anticorpos IgG para *A. phagocytophilum*. Para este fim foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Este teste sorológico foi considerado por muito tempo um dos pilares no diagnóstico para agentes Anaplasmataceae por ser altamente sensível. Todavia, o teste possui uma baixa especificidade, não sendo considerado um teste confirmatório para alguma infecção, pois a presença de altos títulos de anticorpos pode ocorrer mesmo em indivíduos que não estão com a presença do agente, como em indivíduos que eliminaram o agente através da atividade imunológica ou pelo tratamento específico (LITTLE, 2010). Contudo, a presença de anticorpos indica que o indivíduo apresenta ou apresentou a infecção em algum momento, pois os títulos podem permanecer por meses (BARTSCH; GREENE, 1996), sendo essencial apenas para o estudo epidemiológico populacional, verificando se há a presença e o contato do agente na população de animais.

Como citado anteriormente, o teste de imunofluorescência indireta é considerado um teste de alta sensibilidade, entretanto com baixa especificidade por duas razões, um por não evidenciar corretamente se o indivíduo possui a infecção no momento do teste, pois evidencia apenas a presença de anticorpos contra o agente, e o outro motivo é pela formação de reação cruzada para vários outros agentes Anaplasmataceae. Tal problema ocorre principalmente com o teste de Imunofluorescência indireta para *A. phagocytophilum*, na qual amostras positivas para *A. platys* e *E. canis* podem formar reação para este agente especificamente (WANER et al., 2001; ALISSON; LITTLE, 2013). Por este motivo foi realizado a RIFI para *A. phagocytophilum* em todas as amostras, e verificada a proporção epidemiológica para este agente. Posteriormente, os dados de amostras reagentes para *A. phagocytophilum* na RIFI foram confrontados com a presença de amostras positivas em PCR para cada agente, para verificação da especificidade dos testes em questão.

Para formação de dados epidemiológicos, as amostras reagentes pela RIFI para *A. phagocytophilum* foram distribuídas descritivamente para confecção da

proporção deste agente. As amostras de soro foram consideradas reagentes a partir da titulação 400 (diluição 1:400), considerado o “cut off” neste presente estudo. Foi encontrada proporção de 8,33% de amostras reagentes (cinco amostras), sendo considerado o grupo amostral que possuiu contato com o agente em questão. Na figura 15 pode-se verificar tal proporção.

Um trabalho realizado por Billeter e colaboradores (2007) nos Estados Unidos relata a presença da proporção de 4,3% de amostras reativas em felinos, semelhante ao presente trabalho, contudo estes relatam que em áreas endêmicas a proporção de amostras reagentes para este agente chegue a aproximadamente 30%. Esta mesma proporção é verificada no trabalho realizado por Magnarelli e colaboradores (2005), que verificaram também uma frequência de 30% de felinos reagentes para *A. phagocytophilum* no nordeste dos Estados Unidos. A figura 15 demonstra a proporção de amostras reagentes para *A. phagocytophilum*. O resultado do presente trabalho foi muito semelhante ao trabalho realizado por Aguirre e colaboradores (2004) na região central da Espanha que demonstra uma proporção de 4,9% das amostras dos felinos reagentes para este agente. No entanto, um trabalho mais recente realizado por Ayllon e colaboradores (2009) na mesma região na Espanha, demonstrou uma frequência de 7,7% de amostras de felinos que apresentam reação para *A. phagocytophilum*, sendo um valor muito próximo ao atual estudo. Ebani e Bertelloni (2014), na região central da Itália, também verificaram uma proporção muito semelhante, com 4,5% de amostras reagentes.

No Brasil apenas um trabalho realizado por Yamanaka e colaboradores (2014) em Cuiabá, Mato Grosso, demonstrou uma proporção de 7,77% de felinos reagentes para este agente, sendo um valor próximo ao atual estudo.

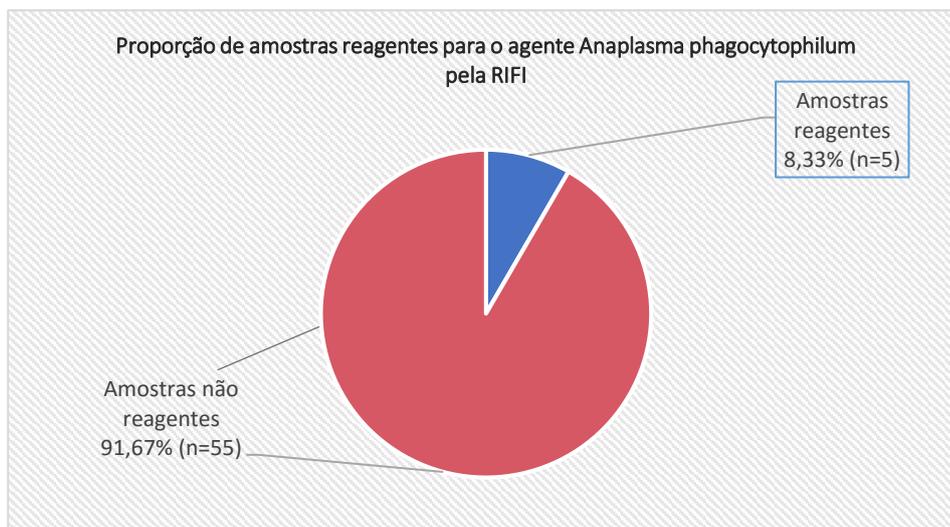


Figura 15: Proporção de amostras reagentes para o agente *Anaplasma phagocytophilum* dentro de uma amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.12- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA *Anaplasma phagocytophilum* COM OS DADOS DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO

No intuito de verificar a especificidade do teste para o estudo epidemiológico, os dados de amostras reagentes para *A. phagocytophilum* foram confrontados com amostras em que foram encontrados corpúsculos de inclusão e amostras que foram positivas na PCR para cada agente estudado. Foi encontrado que, em cinco amostras reagentes, duas amostras apresentaram corpúsculos de inclusão, ou seja, 40% das amostras reagentes para RIFI, como verificado na figura 16. Relatos na literatura têm correlacionado a presença de reagentes para *Ehrlichia* e *Anaplasma* em pacientes com a doença clínica, juntamente com a presença de mórulas em monócitos, neutrófilos e plaquetas (SOLANO-GALLEGO et al., 2006; TARELLO, 2005).

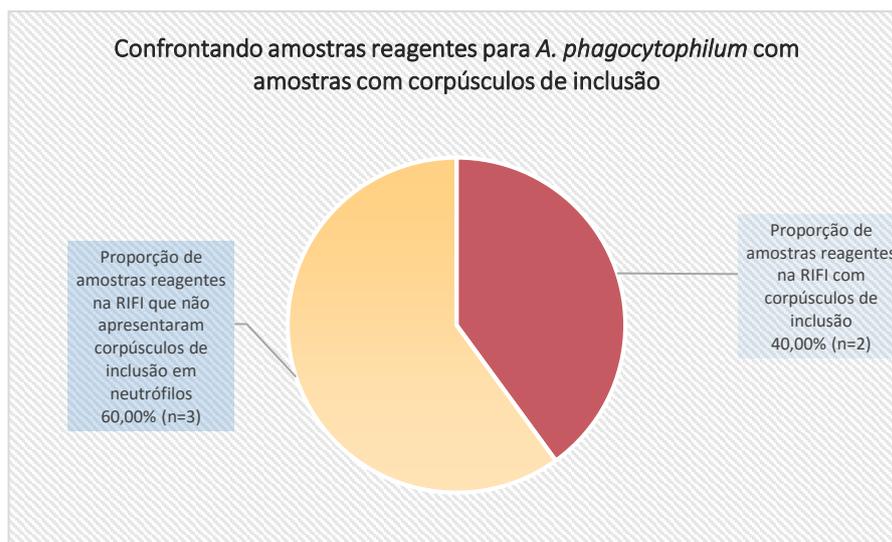


Figura 16: Proporção de amostras reagentes na RIFI para *A. phagocytophilum* que apresentaram corpúsculos de inclusão hematoscopia.

5.13- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA *Anaplasma phagocytophilum* COM AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *A. phagocytophilum*

Seguindo o mesmo critério, as amostras reagentes pela RIFI para *A. phagocytophilum* também foram confrontadas com amostras positivas para PCR para cada agente Anaplasmataceae estudado, a fim de verificar se a presença de infecção para outros agentes é capaz de formar amostras reagentes na RIFI, confirmando assim a reação cruzada, avaliando assim a especificidade do teste. Primeiramente foi investigado se as amostras que foram reagentes tiveram a presença do próprio agente, *A. phagocytophilum*, através da amplificação do DNA do agente pela PCR, ou seja, amostras realmente infectadas. Foi verificado que em cinco amostras reagentes, apenas uma amostra foi positiva na PCR para *A. phagocytophilum*, uma proporção de 20% das amostras reagentes, sendo demonstrada na figura 17. Coincidentemente, nesta mesma amostra que também foi positiva na PCR, foi encontrada mórula em neutrófilo, confirmando que esta mórula realmente era composta por *A. phagocytophilum*. Entretanto, na maioria das amostras reagentes para este agente, não se pôde comprovar a riquetsemia.

Os felinos possuem uma capacidade de formar anticorpos na fase aguda da doença promovida por este agente, desta forma podem-se identificar mórulas em neutrófilos pela hematoscopia, da mesma forma se pode amplificar o DNA do agente na PCR (BJÖERSDORFF, 1999), e isso pode explicar a presença desta amostra reagente na RIFI que foi positiva em PCR no presente estudo. No entanto, isso não acontece normalmente, pois geralmente o tempo de soroconversão acontece na forma crônica da doença, como é relatado também em cão (EBANI; BERTELLONI, 2014). Nesta fase a riquetsemia não pode estar presente e não pode ser identificada tanto em nível microscópico quanto molecular (LITTLE, 2010). No presente estudo verificou-se que na maioria das amostras reagentes para este agente não houve a presença de riquetsemia, como verificado por estes autores (LITTLE, 2010; EBANI; BERTELLONI, 2014).

Billeter e colaboradores (2007) no trabalho realizado em felinos em várias regiões dos Estados Unidos, verificaram que em todas as amostras de felinos que foram positivas na RIFI para *A. phagocytophilum* não houve amplificação na PCR, ou seja, estas mesmas amostras foram negativas. Aguirre e colaboradores (2004), no trabalho realizado na Espanha, verificaram também que todas as amostras reagentes para este agente não foram positivas na PCR. Lappin e colaboradores (2004) elucidam que estes microrganismos evadem para outros tecidos, principalmente linfóides, e nesta condição estes agentes não estão presentes nas amostras sanguíneas. Estes mesmos autores relatam que há persistência de altos títulos de anticorpos mesmo em felinos doentes após a terapia específica, e que por esta circunstância eliminaram o agente, confirmados pela negatividade em análise pela PCR. Uma vez que este diagnóstico da RIFI na identificação do agente é impreciso, então este teste é considerado de baixa especificidade quando comparado com diagnóstico pela PCR.

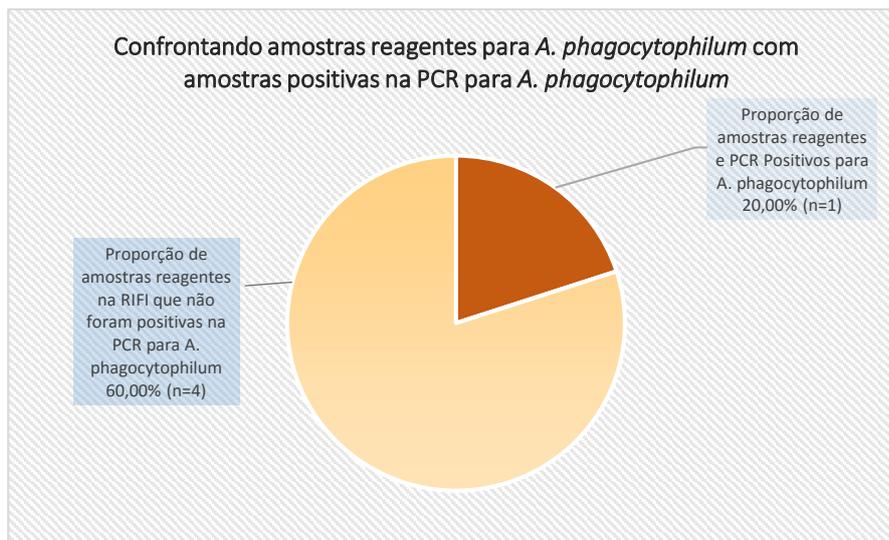


Figura 17: Proporção de amostras reagentes na RIFI para *A. phagocytophilum* que apresentaram amostras positivas na PCR para *A. phagocytophilum*.

5.14- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA *Anaplasma phagocytophilum* COM AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *E. canis*

Foi verificado, a fim de comprovar a presença de reação cruzada, se dentre as amostras reagentes pela RIFI houve a presença de infecções por outros agentes. Assim, foi verificado que em cinco amostras reagentes, uma amostra foi positiva na PCR para *E. canis*, ou seja 20% das amostras reagentes, como demonstrado na figura 18. Alguns autores relatam a reação cruzada entre os dois agentes no ensaio de RIFI, embora a infecção a um agente distinto ao que o teste preconiza possa gerar um título de anticorpo mais baixo do que o título sobre o agente primário avaliado (WANER et al., 2001; LITTLE, 2010). Por este motivo, pode-se entender a presença da reação cruzada para o agente *E. canis* na amostra de um felino, no presente estudo. Entretanto, tal reação enfatiza ainda mais a questão da baixa especificidade do teste, não sendo fidedigno para identificação do agente *A. phagocytophilum*, apesar da utilização de um “cut off” na titulação de 400 como nível limítrofe exigido para considerar a reação positiva, como citado nas instruções de uso do kit sorológico de RIFI.

Em contraste, muitos trabalhos relatam a inexistência de reação cruzada nos testes sorológicos entre *A. phagocytophilum* e *E. canis*, como o trabalho realizado por

Solano-Gallego e colaboradores (2006) na Espanha, na qual relatam que em todas as amostras reagentes para *A. phagocytophilum*, os mesmos não tiveram a amplificação do DNA na PCR para o agente *E. canis*. O mesmo pode ser relatado no estudo realizado por Billeter e colaboradores (2007), nos Estados Unidos, que sugeriram que as 18 amostras reagentes para *A. phagocytophilum* poderiam ser consequência da reação cruzada para *E. canis*, mas não houve a confirmação deste agente na PCR.

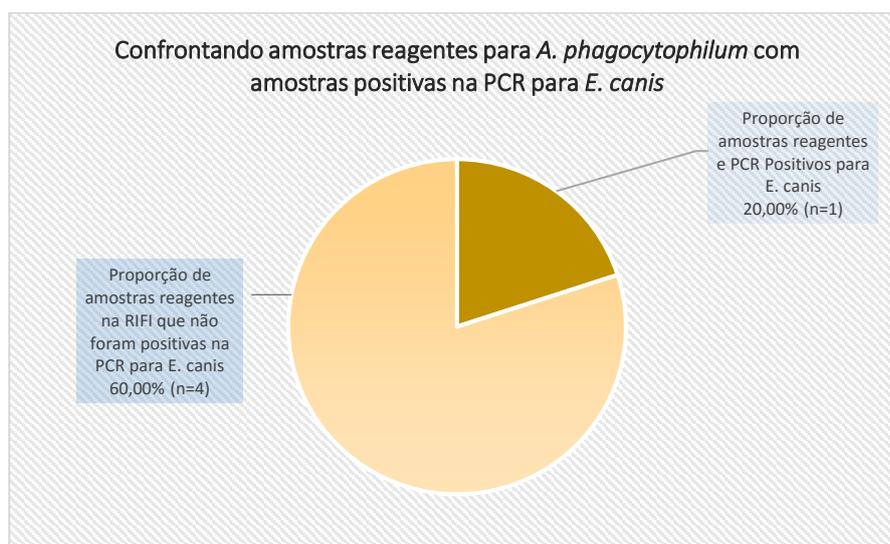


Figura 18: Proporção de amostras reagentes na RIFI para *A. phagocytophilum* que apresentaram amostras positivas na PCR para *E. canis*.

5.15- CONFRONTANDO AS AMOSTRAS REAGENTES NA RIFI PARA *Anaplasma phagocytophilum* COM AMOSTRAS POSITIVAS NA PCR PARA *A. platys*

Como muitos autores relatam, geralmente, a presença do agente *A. platys* na amostra promove a reação cruzada na imunofluorescência indireta para *A. phagocytophilum*, pois os anticorpos IgG contra o agente *A. platys* podem se ligar aos antígenos de *A. phagocytophilum* na lâmina de imunofluorescência, gerando reação de fluorescência (HARVEY, 2012). De acordo com Heikkilä e colaboradores (2010), estas reações cruzadas estão mais relacionadas com a presença do agente *A. platys*. No entanto, após a reclassificação dos gêneros por Dumler e colaboradores (2001), estas evidências ficaram um pouco confusas. Contraposto a isso, no presente estudo

não foi verificada a presença de amostras positivas na PCR para *A. platys* dentre as amostras reagentes na RIFI para o agente *A. phagocytophilum*. O estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2008), realizado no Brasil, se assemelha ao atual estudo, em cujo trabalho não foi observada reação cruzada no teste imunoenzimático na detecção de anticorpos contra *A. phagocytophilum* em amostras positivas na PCR para *A. platys*.

5.16- TAXAS DE COINFECÇÃO

Os dados obtidos para coinfeção na epidemiologia da região são mais apurados e fidedignos quando utilizados os dados moleculares, por serem considerados testes altamente sensíveis e específicos, pois comprovam a presença do agente estudado no indivíduo (AGUIRRE et al., 2004). Por esta razão, estes dados são os que melhor representam a epidemiologia no presente estudo. Portanto, estes dados moleculares são importantes para determinar e comprovar as taxas de coinfeção entre os agentes estudados. Logicamente que este estudo foi realizado formando as proporções retiradas da amostra populacional de 60 amostras dos felinos domésticos, gerando as taxas de coinfeção na amostra populacional, por sua vez sendo consideradas também um estudo epidemiológico.

A taxa de coinfeção encontrada para *E. canis* e *A. phagocytophilum* na amostra populacional foi de 1,67%, ou seja, apenas 1 felino de 60 possuiu a infecção por estes dois agentes. Não foram encontrados relatos de coinfeção entre estes dois agentes em felinos, e alguns autores justificam que o relato de coinfeções entre estes agentes não ocorre devido à dificuldade de se suspeitar da doença e de se diagnosticar a infecção por *A. phagocytophilum* (CARRADE et al., 2009), por esta razão são geradas poucas informações para este agente em particular. Mas, foi muito importante este relato no presente estudo, sendo considerado inédito na região. A primeira evidência da coinfeção entre os dois agentes foi relatada por Silveira e colaboradores (2015), entretanto, sendo encontrado 1 paciente canino positivo para ambos os agentes. Muitos trabalhos relatam reação cruzada ou presença de coinfeções através da análise sorológica, mas sem confirmações por testes mais específicos (EBANI; BERTELLONI, 2014).

A taxa de coinfeção encontrada de *A. platys* e *A. phagocytophilum* foi de 3,33%, sendo 2 animais da amostra populacional. Não foram encontrados relatos em literatura sobre tais coinfeções, necessitando de mais estudos sobre estes casos no presente trabalho. Sabe-se que muitas pesquisas correlacionadas são de reações cruzadas e coinfeções verificadas através de testes sorológicos relatados em vários trabalhos (HEIKKILÄ et al., 2010; HARVEY, 2012), mas não sobre coinfeção entre estes dois agentes pela PCR.

Não foi encontrada taxa de coinfeção entre *E. canis* e *A. platys* no presente trabalho. Vários trabalhos têm demonstrado coinfeções entre estes dois agentes (LITTLE, 2010). A infecção causada apenas por *A. platys* é relativamente baixa, por outro lado a coinfeção com *E. canis* tem demonstrado elevadas alterações clínicas e laboratoriais em pacientes veterinários, principalmente no cão (HARVEY, 2006; GAUNT et al., 2010). A figura 19 demonstra os gráficos representando estas taxas de coinfeção.

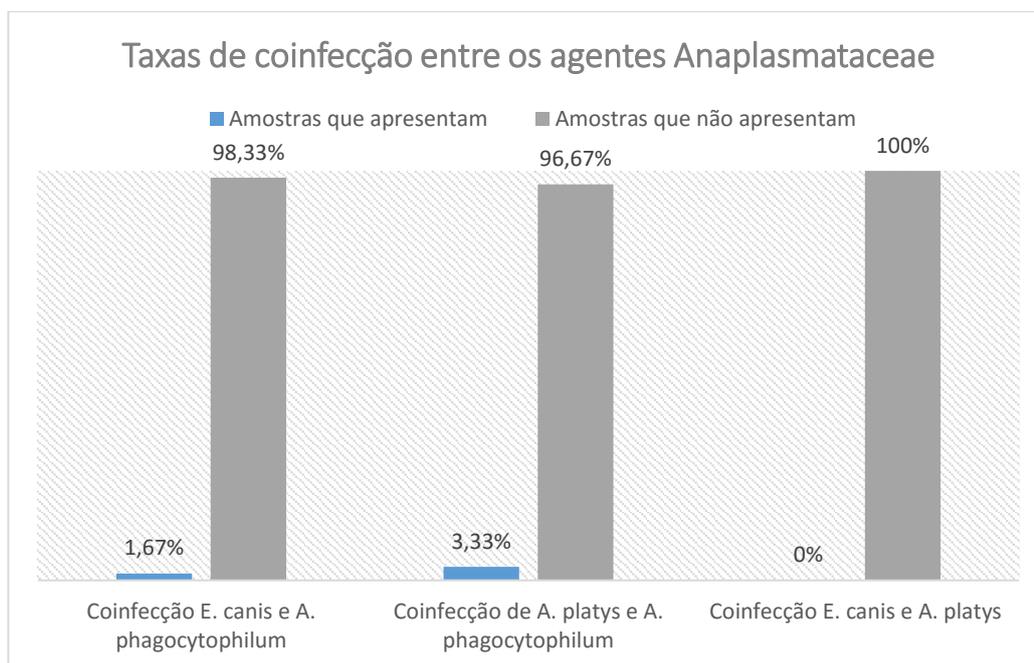


Figura 19: Taxas de coinfeção entre agentes Anaplasmataceae na amostra populacional (n=60) no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

5.17- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE

Os dados discutidos até o momento foram epidemiológicos, no entanto o presente trabalho também contém alguns pontos principais que são as alterações clínicas e laboratoriais promovidas pelas infecções por estes agentes nos felinos. Estes dados foram adquiridos através das fichas clínicas e dos dados laboratoriais hematológicos e bioquímicos séricos, lembrando que os animais passaram por atendimentos clínicos, independente de suas condições de sanidade, na qual foram realizados o preenchimento da ficha clínica no ato do atendimento e a coleta de amostras sanguíneas para a realização dos hemogramas e das bioquímicas séricas para a avaliação das funções hepática e renal. A ficha clínica pode ser visualizada no anexo 1 do trabalho. Estes dados foram considerados clínico-patológicos. Os dados foram distribuídos para a formação descritiva das proporções das alterações clínicas e laboratoriais, sendo escolhidas as alterações dos animais que foram positivos na PCR para os agentes, que por sua vez continham a infecção.

Apesar da descrição de alterações compatíveis com as doenças Erliquiose e Anaplasmose, estas mesmas não são bem entendidas em felinos, devido à inespecificidade destas alterações, além do surgimento de algum sinal ou sintoma ser raro quando comparados aos cães (STUBBS et al., 2000). Sabe-se que os felinos domésticos são susceptíveis a infecções experimentais por *A. phagocytophilum*, nas quais há alguns relatos, mas tentativas de infecções experimentais com *E. canis* não têm sido relatadas, sendo escassas as informações sobre alterações compatíveis com as doenças em tais infecções (LITTLE, 2010). No entanto, pouco se sabe sobre as infecções naturais nos felinos domésticos e suas implicações clínicas e laboratoriais.

Primeiramente, foram verificadas as frequências das alterações clínicas nos felinos positivos na PCR para qualquer agente Anaplasmataceae, ou seja, dentre os 20 animais que foram positivos para os agentes desta família. As alterações clínicas que mais se destacam nestes felinos foram a linfadenomegalia (25%), presença de vetores (25%), neste caso as pulgas, letargia (15%), mucosas pálidas (15%). Já outras alterações que foram encontradas foram perda de peso (5%), edema (5%), dificuldade de locomoção (5%), êmese (5%), afecção ocular (5%) e desidratação (5%). A ocorrência de infecções naturais por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (principais

representantes da família Anaplasmataceae em felinos) tem sido documentada nos gatos e as apresentações clínicas mais comuns foram febre, letargia e anorexia (BOULOY et al, 1994; BREITSCHWERDT et al., 2002; LAPPIN et al., 2004).

Os sinais predominantes reportados em gatos com erliquiose incluem a febre, letargia, mialgia, dispneia e linfadenomegalia (STUBBS et al., 2000). Alterações na locomoção e poliartrites também têm sido reportadas (BREITSCHWERDT et al., 2002; STUBBS et al., 2000). Sintomas e sinais similares têm aparecido em felinos com infecções por *A. phagocytophilum*, incluindo dor nas articulações e dificuldade de locomoção, linfadenomegalia, perda de peso, assim como outras alterações como doenças periodontais, conjuntivites e sinais neurológicos (BOULOY et al, 1994; STUBBS et al., 2000; BREITSCHWERDT et al., 2002; LAPPIN et al., 2004; TARELLO, 2005; LITTLE, 2010). Como verificado, os sinais e sintomas que mais representam as alterações promovidas em ambos os gêneros são dificuldade de locomoção e linfadenomegalia, sendo também encontrado no atual estudo. Entretanto, foram encontradas várias outras alterações e estas serão detalhadas e explicadas nas infecções por cada agente especificamente. As frequências destas alterações em animais infectados por agentes Anaplasmataceae do presente estudo podem ser verificadas na figura 20, logo abaixo.

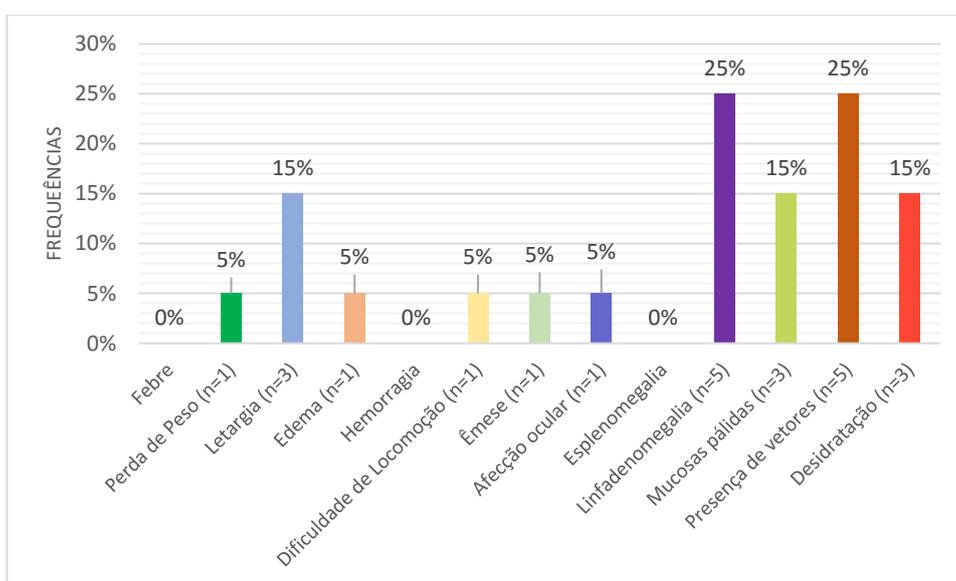


Figura 20: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para agentes da família Anaplasmataceae (n=20) em Campos dos Goytacazes, RJ.

5.18- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA *E. canis*

As mesmas alterações clínicas foram verificadas em pacientes que foram positivos na PCR para cada agente. Desta forma, foram distribuídas as frequências das alterações clínicas em felinos domésticos positivos para *E. canis*, entre 5 animais positivos na PCR, e foram verificadas poucas alterações clínicas na erliquiose felina. As alterações consistiram em presença de vetores (40%), linfadenomegalia (20%) e desidratação (20%). Já as demais alterações clínicas não foram verificadas nos animais com a presença da infecção por este agente. Tais frequências estão demonstradas na figura 21.

Vale ressaltar que os vetores encontrados no atual trabalho foram apenas pulgas, não houve evidência da presença de carrapatos, em histórico, anamnese e exame físico. Muitos trabalhos relatam a não presença de carrapatos, potenciais vetores dos agentes riquetsiais, devido ao comportamento do felino em remover estes ectoparasitas (KIDD, BREITSCHWERDT, 2003). Braga e colaboradores (2014), no trabalho realizado em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, também não encontraram carrapatos nos pacientes positivos para *E. canis*.

De acordo com Allinson e Little (2013) a linfadenomegalia é mais comum em cães, não sendo comum esta evidenciação em felinos na infecção por este agente. Contrastando com eles, apenas um animal identificado na PCR com *E. canis* possuiu linfadenomegalia. No entanto este achado é evidenciado nos estudos relacionados às infecções riquetsiais (STUBBS et al., 2000), principalmente na erliquiose felina. Outro achado, apesar de inespecífico, foi a desidratação em um paciente, mas esta informação não aparenta ser relevante para corroborar com a doença causada por este agente, da mesma forma que não há evidências na literatura deste achado. Apesar disso Almosny e Massard (2002) relatam a desidratação em pacientes após 5 dias de inoculação. A perda de peso também pode ser verificada e é descrita pelos mesmos autores.

Braga e colaboradores (2012) descrevem que a infecção por *E. canis* em felinos não é comum, como pode ser verificado também na distribuição da frequência encontrada em felinos no presente estudo. Logo, as informações relacionadas às alterações clínicas são escassas.

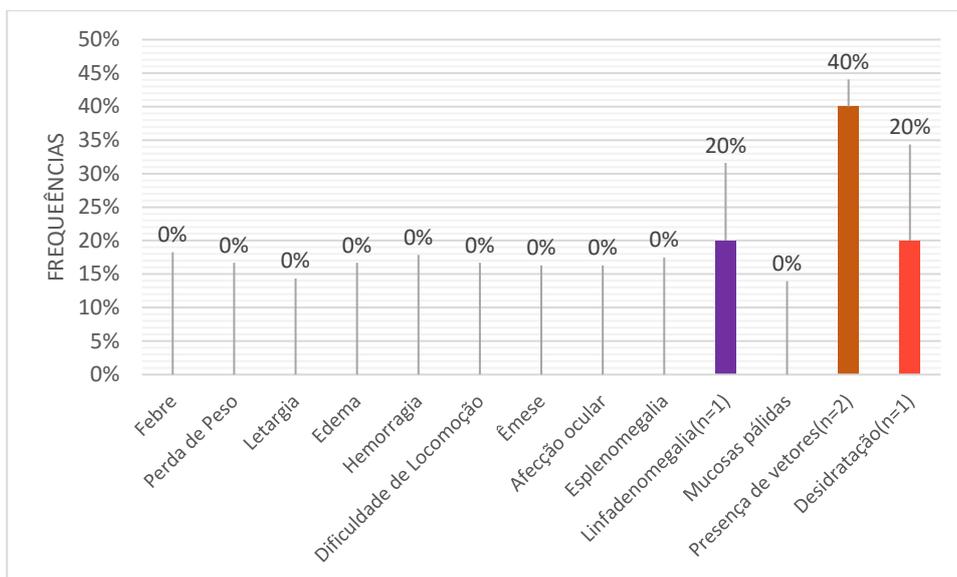


Figura 21: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para *Ehrlichia canis* (n=5) em Campos dos Goytacazes, RJ.

5.19- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA *A. platys*

As alterações clínicas em animais positivos na PCR para *A. platys* foram encontradas em maior frequência, contrastando com as frequências dos animais positivos para os outros agentes estudados. Foram encontradas nos 12 animais infectados para este agente a perda de peso (8,33%), a letargia (25%), dificuldade de locomoção (8,33%), êmese (8,33%), afecção ocular (8,33%), linfadenomegalia (25%), mucosas pálidas (25%), presença de vetores (16,67%) e desidratação (16,67%). Estas frequências estão demonstradas na figura 22.

Embora os felinos acometidos pela *A. platys* sejam na sua maioria assintomáticos, as manifestações clínicas de cães infectados variam, sendo mais frequentemente observadas depressão, anorexia, letargia, emaciação, linfadenomegalia, palidez de mucosas e febre (HARRUS et al., 1997; SANTAREM et al., 2005). Muitas destas alterações foram semelhantes ao atual trabalho. Allison e Little (2013) descrevem em seu trabalho que a presença de sinais clínicos no gato com a infecção é questionável. Alguns trabalhos, entretanto, inclusive o de Correa e colaboradores (2011), não evidenciaram a presença de alterações clínicas em felinos com infecções por *A. platys*. Harrus e colaboradores (1997) relatam ainda que as

infecções concomitantes por *A. platys* e *E. canis* são muito comuns, podendo contribuir para a patogênese de *A. platys* e a presença de sinais clínicos.

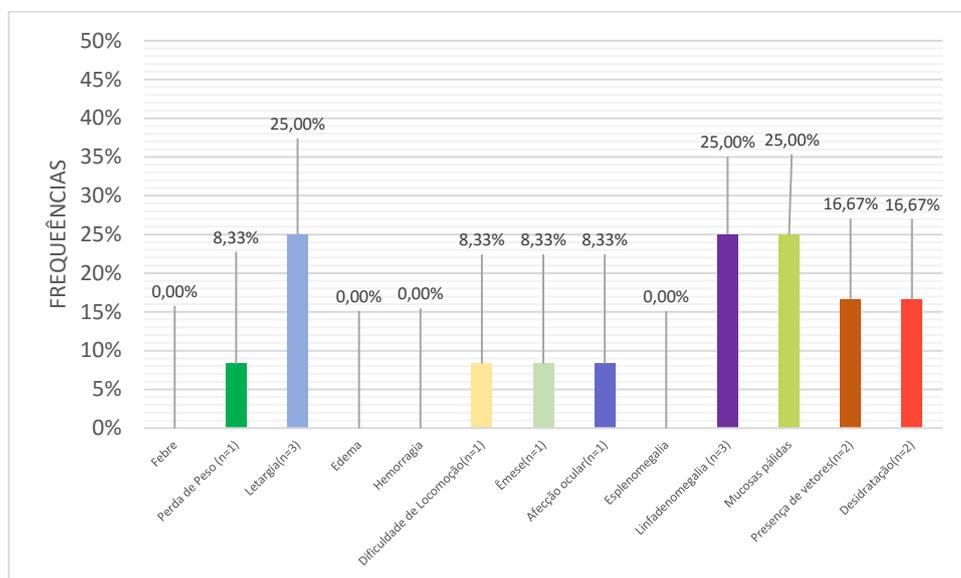


Figura 22: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para *Anaplasma platys* (n=12) em Campos dos Goytacazes, RJ.

5.20- ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA *A. phagocytophilum*

Vários autores têm relatado as alterações clínicas em felinos com infecções por *A. phagocytophilum* (LITTLE, 2010). Dentre as principais alterações incluem febre, dor nas articulações e dificuldade de locomoção, linfadenomegalia, perda de peso, assim como outras alterações como doenças periodontais, conjuntivites e sinais neurológicos (BOULOY et al, 1994; STUBBS et al., 2000; BREITSCHWERDT et al., 2002; LAPPIN et al., 2004; TARELLO, 2005). Os sinais e sintomas descritos na anaplasmoose granulocítica felina são muito semelhantes aos descritos na doença em cães. Em ambas as espécies as manifestações clínicas são febre, letargia e anorexia (BJÖERSDORFF et al., 1999; LAPPIN et al., 2004). Tais alterações são consideradas inespecíficas (TARELLO, 2005) e acredita-se que a doença promove imunossupressão no paciente e a consequência é a infecção secundária que promove muitas das alterações clínicas relatadas (FOLEY et al., 2003).

Os felinos que estavam infectados pelo agente *A. phagocytophilum* foram os que menos apresentaram alterações clínicas. Ao todo foram 6 animais positivos na PCR para este agente. As principais alterações clínicas foram apenas a linfadenomegalia (33,33%) e a presença de vetores (33,33%). Estas frequências podem ser verificadas na figura 23. A alteração que mais se assemelha a outros autores é a linfadenomegalia. Diferentemente, muitos outros trabalhos relatam várias outras alterações como taquipneia, dor nas articulações, pescoço rígido, linfadenomegalia, gengivite, periodontite, conjuntivite, perda de peso, vômitos, faringite, polidipsia, hematúria e problemas neurológicos como tremores e incoordenação motora (TARELLO, 2005). E em humanos ainda há relatos de outras alterações como erupção de pele, dor de cabeça, esplenomegalia e distúrbios gastrintestinais (CHOCHLAKIS et al., 2008). Heikkilä e colaboradores (2010) ainda relatam a presença de dor abdominal, corrimento lacrimal em ambos os olhos e, diferentemente do atual trabalho, a presença de carrapatos nos pacientes.

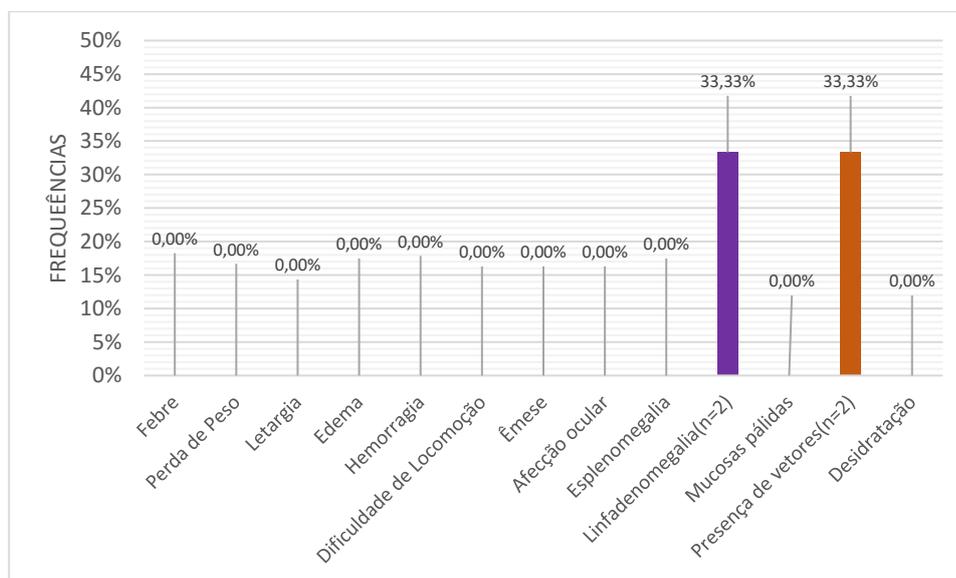
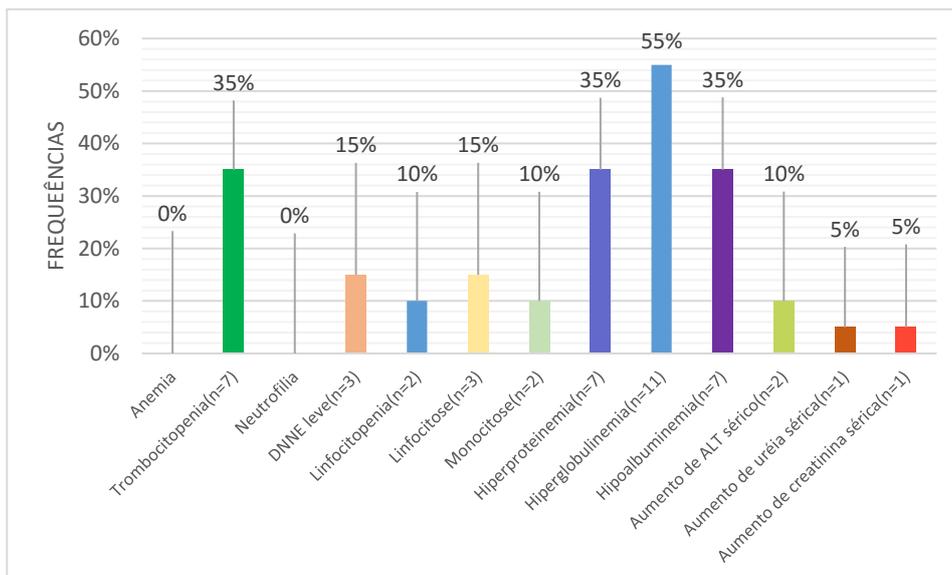


Figura 23: Alterações clínicas frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para *Anaplasma phagocytophilum* (n=6) em Campos dos Goytacazes, RJ.

5.21- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA AGENTES ANAPLASMATACEAE

Da mesma maneira, foram verificadas as frequências das alterações laboratoriais em felinos positivos na PCR para os agentes da família Anaplasmataceae do presente estudo. Os achados mais comuns em felinos com a presença de agentes Anaplasmataceae são anemia, leucocitose, leucopenia, linfocitose, neutrofilia, desvio nuclear neutrofílico à esquerda (DNNE), monocitose, linfocitopenia, trombocitopenia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, alterações renais (pelos níveis de uréia e creatinina sérica) e alteração hepática (aumento de alanina aminotransferase) (AGUIRRE et al., 2004; ORTUÑO et al., 2005; LITTLE, 2010; BERGMANN et al., 2015; HEGARTY et al., 2015).

Inicialmente, foram verificadas as alterações laboratoriais mais frequentes dentro dos 20 animais positivos para algum agente da referida família. Notadamente estas alterações foram muito semelhantes às descritas pela literatura. As principais alterações foram trombocitopenia (35%), hiperproteinemia (35%), hiperglobulinemia (55%) e hipoalbuminemia (35%). As demais alterações foram neutrofilia (15%), desvio nuclear de neutrófilos à esquerda leve – DNNE leve - (15%), linfocitopenia (10%), linfocitose (15%), monocitose (10%), aumento de alanina aminotransferase sérica – ALT - (10%), aumento de uréia sérica (5%) e aumento de creatinina sérica (5%). Estas alterações podem ser verificadas na figura 24. Estas alterações foram adequadamente descritas em cada agente da família.



DNNE- Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

ALT – Alanina aminotransferase.

Figura 24: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para agentes da família Anaplasmataceae (n=20) em Campos dos Goytacazes, RJ.

5.22- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA *E. canis*

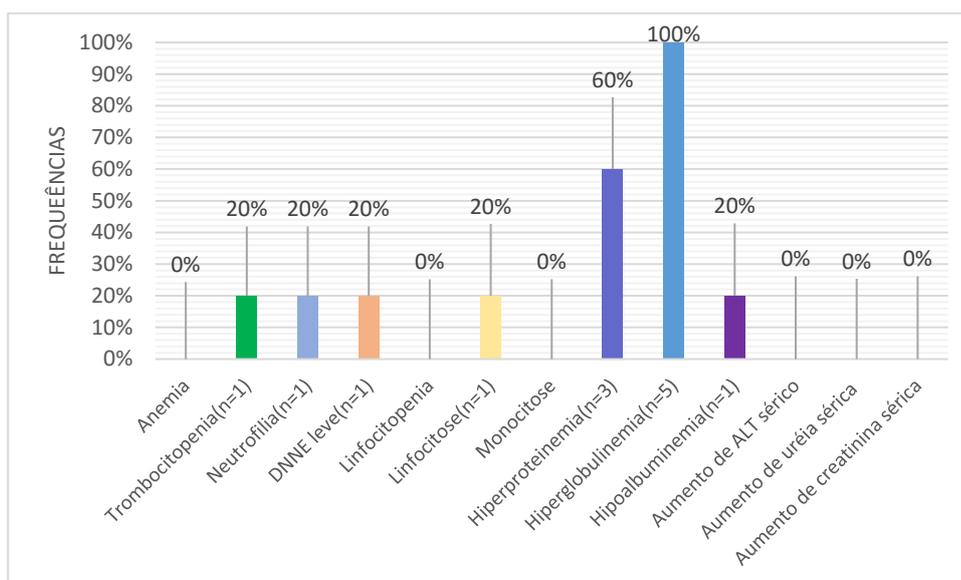
Do mesmo modo, foram verificadas as alterações laboratoriais dos felinos positivos na PCR para *E. canis*, ou seja, nos felinos com a infecção para este agente. Lembrando que foram apenas 5 animais positivos na PCR para *E. canis*. As principais alterações laboratoriais foram hiperglobulinemia (100%) e hiperproteinemia (60%). As demais alterações laboratoriais foram trombocitopenia (20%), neutrofilia (20%), DNNE leve (20%), linfocitose (20%) e hipoalbuminemia (20%). A figura 25 demonstra as estas alterações laboratoriais.

As alterações mais frequentes nos animais foram a hiperglobulinemia e hiperproteinemia. A hiperproteinemia tem sido descrita em vários estudos. A hiperproteinemia é originada por uma hiperglobulinemia, que por sua vez é consequência de uma hipergamaglobulinemia (aumento de imunoglobulinas séricas), devido ao aumento da resposta humoral frente aos agentes riquetsiais (ALMOSNY, 1998; STUBBS et al, 2000; AGUIRRE et al., 2004). A hipoalbuminemia nos felinos

que possuem as doenças riquetsiais pode ser justificada pela anorexia e prostração ocorrentes uma semana após a infecção (ALMOSNY; MASSARD, 2002).

A linfocitose tem sido o achado mais encontrado em cães (LITTLE, 2010), não há informações relativas a este achado na erliquiose felina. A neutrofilia e o DNNE não têm sido também um achado muito comum na erliquiose felina nos estudos de outros autores (SOLANO-GALLEGO et al., 2006; BRAGA et al., 2013; HEGARTY et al. 2015), entretanto Almosny e Massard (2002) relatam que a neutrofilia com DNNE pode ser encontrada, principalmente na fase aguda da infecção.

A trombocitopenia não foi uma marcante alteração no atual trabalho. A redução das plaquetas é justificada pela redução da meia-vida das plaquetas, resultante de sua destruição, decorrente da estimulação do sistema imunológico, da intensa ativação da cascata de coagulação e também por parte da inflamação imunomediada dos vasos sanguíneos (MENDONÇA et al., 2005).



DNNE- Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

ALT – Alanina aminotransferase.

Figura 25: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para *Ehrlichia canis* (n=5) em Campos dos Goytacazes, RJ.

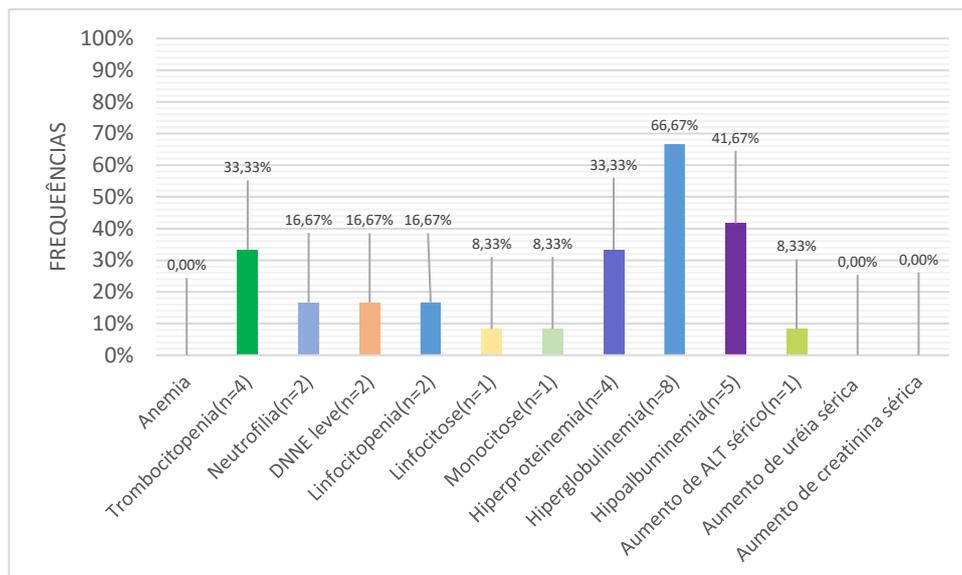
5.23- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA *A. platys*

Assim como descrito anteriormente nas alterações clínicas, as alterações laboratoriais em pacientes positivos para *A. platys* foram as mais frequentes e em

maior número, diferentemente das alterações encontradas nos pacientes infectados por outros agentes. As proporções das alterações laboratoriais descritas foram dos 12 animais positivos para este agente. As alterações mais frequentes foram hiperglobulinemia (66,67%), hiperproteinemia (33,33%), hipoalbuminemia (41,67%) e trombocitopenia (33,33%). As demais alterações foram neutrofilia (16,67%), linfocitopenia (16,67%), linfocitose (8,33%), monocitose (8,33%) e aumento de ALT sérica (8,33%). O gráfico destas alterações pode ser verificado na figura 26.

Os achados de hiperglobulinemia e hiperproteinemia foram semelhantes aos encontrados por Correa e colaboradores (2011). Estas mesmas alterações são relatadas por Hegarty e colaboradores (2015) para este agente. Não há trabalhos justificando a presença de hipoalbuminemia em felinos com infecção por *A. platys* (CORREA et al., 2011; SOUSA, 2006).

Não há relatos fidedignos sobre a linfocitose, linfocitopenia e neutrofilia na infecção por *A. platys*. Em um trabalho realizado por Santarém e colaboradores (2005) foi relatado linfocitopenia e neutropenia em pacientes infectados, mas apenas positivos pela presença de mórulas em plaquetas na hematoscopia. A monocitose encontrada em apenas um paciente não condiz com a infecção por este agente, no entanto isto tem sido relatado em infecções por *A. phagocytophilum* (LAPPIN et al., 2004). Alguns animais apresentaram também trombocitopenia, como relatam Zobba e colaboradores (2015) que demonstraram, em seu trabalho. No entanto, um trabalho realizado por Allison e Little (2013) questiona a presença de trombocitopenia em felinos com *A. platys*. Embora possa aparecer estes relatos nos felinos, a trombocitopenia é marcante nos pacientes caninos que possuem a infecção por este agente (LITTLE, 2010).



DNNE- Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

ALT – Alanina aminotransferase.

Figura 26: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para *Anaplasma platys* (n=12) em Campos dos Goytacazes, RJ.

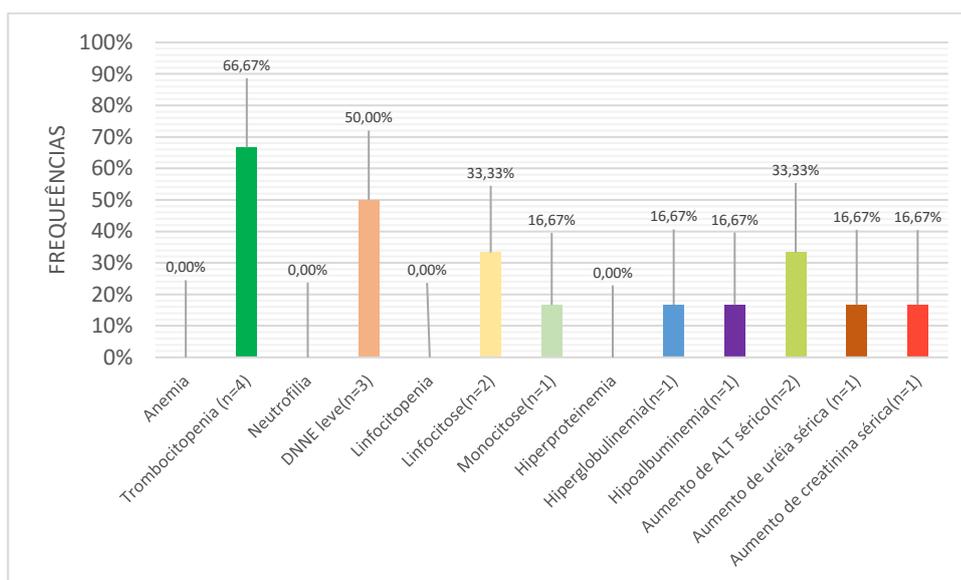
5.24- ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM ANIMAIS POSITIVOS PARA *A. phagocytophilum*

Apenas 6 animais apresentaram infecções para o agente *A. phagocytophilum*. As alterações laboratoriais foram trombocitopenia (66,67%), DNNE leve (50%), linfocitose (33,33%), monocitose (16,67%), hiperglobulinemia (16,67%), hipoalbuminemia (16,67%), aumento de ALT (33,33%), aumento de uréia (16,67%) e aumento de creatinina (16,67%). As frequências destas alterações estão ilustradas no gráfico na figura 27.

Muitos trabalhos relatam a presença de trombocitopenia em felinos com a infecção (LAPPIN et al., 2004; MAGNARELLI et al., 2005; BERGMANN et al., 2015). Bergmann e colaboradores (2015) relatam ainda a presença de DNNE nos animais, possivelmente fundamentada pelas infecções agudas do *A. phagocytophilum*. A linfocitose e monocitose também são relatadas em alguns trabalhos com esta infecção (LAPPIN et al., 2004; BERGMANN et al., 2015). A hiperglobulinemia e hiperproteïnemia não são relatadas na infecção por este agente (HERGARTY et al., 2015). Da mesma forma, a hipoalbuminemia não representa uma marcante alteração

por este agente nos felinos, pois não há esta alteração associada à doença como demonstrado no trabalho por Savidge e colaboradores (2015). Diferentemente, no atual trabalho, a hiperglobulinemia e como consequência a hiperproteinemia são algumas alterações presentes, justificadas possivelmente pela atuação humoral em resposta a infecção (ALMOSNY, 1998; AGUIRRE et al., 2004).

Outra alteração encontrada foi o aumento da enzima hepática Alanina aminotransferase (ALT). Little (2010), em sua revisão, relata a associação desta alteração com a doença. Apenas 1 animal com a infecção possuiu aumento dos níveis dos marcadores renais uréia e creatinina séricas, justificando uma injúria renal neste paciente. No trabalho realizado por Bergmann e colaboradores (2015) também demonstrou um paciente com falha renal e estes autores afirmam que a presença de *A. phagocytophilum* pode agravar uma falha renal preexistente, não sendo o causador primário da lesão, justificando o aumento destes níveis.



DNNE- Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

ALT – Alanina aminotransferase.

Figura 27: Alterações laboratoriais frequentes em felinos domésticos positivos em PCR para *Anaplasma phagocytophilum* (n=6) em Campos dos Goytacazes, RJ.

5.25- CORRELAÇÕES ENTRE AS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS E ANIMAIS INFECTADOS COM AGENTES ANAPLASMATACEAE

Como verificadas anteriormente as principais alterações laboratoriais encontradas nos felinos domésticos positivos para os agentes da Anaplasmataceae foram trombocitopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Todas estas alterações estão presentes com grande frequência em pacientes que possuem as doenças promovidas por estes agentes, assim como relatadas e devidamente justificadas em outros estudos (STUBBS et al, 2000; AGUIRRE et al., 2004; SOUSA, 2006; CORREA et al., 2011; HEGARTY et al., 2015). Devido a estas evidências foi pertinente utilizar os dados clínicos-patológicos para verificação da correlação não paramétrica dos dados de animais com estas alterações laboratoriais e a presença da infecção por algum agente desta família. Desta forma, sendo importante verificar se estas determinadas alterações laboratoriais são independentes ou dependentes destas infecções (animais positivos na PCR para agentes da família Anaplasmataceae).

Logo abaixo se encontra a tabela 4 que demonstra o teste Qui-quadrado utilizando os dados de globulinas. No cálculo do Qui-quadrado foi verificado que não se rejeita a hipótese de que as variáveis ocorrem de forma independente. Desta forma, não se pôde confirmar se a alteração como hiperglobulinemia é dependente da presença de infecções em animais positivos na PCR para quaisquer agentes da família Anaplasmataceae. A tabela demonstra o planejamento do Qui-quadrado e, como considerações, pode-se observar que o calculado (χ^2_c) possui o valor menor que o tabelado (χ^2_t), no nível de significância de 5%.

Tabela 4: Números de animais relacionados entre as variáveis graus dos parâmetros para os níveis de globulina (y_i) e grupos de animais, e os cálculos de qui-quadrado.

Número de animais	Graus dos parâmetros (y_i)			χ^2_c	χ^2_t ($p \leq 5\%$)
	Normal (3,17-4,69 g/dl)	Lesão inicial (4,72-5,38 g/dl)	Lesão avançada ($\geq 5,44$ g/dl)		
Grupos de animais (x_i)					
Controle	6	4	6	3,25	9,48
Suspeitos negativos	10	6	7		
Suspeitos positivos	4	8	9		

A tabela 5 representa o teste Qui-quadrado utilizando os dados de albumina. No cálculo do Qui-quadrado foi verificado que não se rejeita a hipótese de que as variáveis ocorrem de forma independente. Desta forma, não se pôde confirmar se a alteração como hipoalbuminemia é dependente da presença de infecções em animais positivos na PCR para quaisquer agentes da família Anaplasmataceae. Da mesma forma que a anterior, a tabela demonstra o planejamento do Qui-quadrado e observa-se que o calculado (χ^2c) possui o valor menor que o tabelado (χ^2t), no nível de significância de 5%.

Tabela 5: Números de animais relacionados entre as variáveis graus dos parâmetros para os níveis de albumina (y_i) e grupos de animais, e os cálculos de qui-quadrado.

Número de animais	Graus dos parâmetros (y_i)			χ^2c	χ^2t ($p \leq 5\%$)
	Normal ($\geq 2,64$ g/dl)	Lesão inicial (2,31-2,63 g/dl)	Lesão avançada (1,7-2,28 g/dl)		
Controle	7	9	2	6,28	9,48
Suspeitos negativos	8	6	8		
Suspeitos positivos	6	5	9		

Já a tabela 6 representa o teste Qui-quadrado utilizando os dados de contagem de plaquetas. No cálculo do Qui-quadrado foi verificado que não se rejeita a hipótese de que as variáveis ocorrem de forma independente. Desta forma, não se pôde confirmar se a alteração como trombocitopenia é dependente da presença de infecção em animais positivos na PCR para quaisquer agentes da família Anaplasmataceae. Da mesma forma, a tabela demonstra o planejamento do Qui-quadrado e verifica-se que o calculado (χ^2c) possui o valor menor que o tabelado (χ^2t), no nível de significância de 5%.

Tabela 6: Números de animais relacionados entre as variáveis graus dos parâmetros para os níveis de plaquetas (y_i) e grupos de animais, e os cálculos de qui-quadrado.

Número de animais	Graus dos parâmetros (y_i)			χ^2c	χ^2t ($p \leq 5\%$)
	Normal ($\geq 271 \times 10^3/\mu l$)	Lesão inicial (195-268 $\times 10^3/\mu l$)	Lesão avançada (64-185 $\times 10^3/\mu l$)		
Grupos de animais (x_i)					
Controle	4	5	7	2,29	9,48
Suspeitos negativos	9	6	8		
Suspeitos positivos	5	9	7		

Como se pôde perceber, a análise destes dados revela que a hiperglobulinemia, a hipoalbuminemia e a trombocitopenia são independentes da presença de animais positivos para algum agente da família Anaplasmataceae. Isso possivelmente pode ser consequência de que animais comprovadamente negativos também possuíram estas mesmas alterações laboratoriais. Portanto, apesar de entender que estas alterações apareçam em grandes proporções em animais positivos, estas mesmas não podem ser consideradas afirmativas de que os animais com tais alterações sejam considerados suspeitos diretamente para agentes Anaplasmataceae. Entretanto, percebe-se que estes dados têm caráter complementar, necessitando associar os dados clínicos no ato do atendimento e outras alterações laboratoriais para se considerar que estes animais sejam suspeitos para alguma doença Anaplasmataceae, até que se chegue a confirmação pelo diagnóstico por hematoscopia ou testes mais apurados como sorologia ou PCR.

Alguns trabalhos procuraram realizar associações semelhantes para estas variáveis (BRAGA et al., 2013; CORREA et al., 2011) e também verificaram que as variáveis não dependem da positividade do agente Anaplasmataceae. Portanto, entende-se que as alterações laboratoriais em felinos são consideradas achados inespecíficos. Little (2010) defende esta assertiva, explicando que o diagnóstico da erliquiose e anaplasmose se faz através da combinação dos dados do histórico, anamnese, exame físico e, por fim, das alterações laboratoriais para se suspeitar destas doenças, e desta forma realizar as análises necessárias e confirmatórias como presença de corpúsculos de inclusão, sorologia e PCR para a conclusão da suspeita clínica. Portanto, as alterações laboratoriais, exclusivamente, não são consideradas achados que comprovam a presença de algum agente, devendo ser consideradas somente achados parciais.

6- CONCLUSÕES

- O método mais eficaz para averiguação da epidemiologia de uma determinada população de felinos é através da obtenção de dados moleculares, ou seja, através da PCR;

- O teste sorológico para identificação de *A. phagocytophilum* é importante para determinação da epidemiologia da população, no entanto para avaliação da presença do agente, de forma individual, não é considerado fidedigno;

- A visualização de corpúsculo de inclusão pela hematoscopia é considerada de grande relevância no diagnóstico para Anaplasmataceae, apesar da baixa sensibilidade no diagnóstico;

- A identificação dos agentes *E. canis* e *A. platys* visa esclarecer a doença na região, da mesma forma sendo substancial para que seja instrumento de orientação da doença pelo médico veterinário ao proprietário para que tenha medidas adequadas de tratamento e prevenção;

- A presença de agentes *A. phagocytophilum* é considerada, sem dúvidas, uma notificação importante devido ao potencial zoonótico. Tal risco tem que ser estudado intensamente devido aos fatores biológicos existentes como vetores responsáveis pela transmissão, capacidade de inoculação e capacidade de infecção;

- Neste contexto, a investigação do possível papel dos felinos domésticos na epidemiologia das doenças riquetsiais, é fundamental para a saúde pública, destarte, ações que visem à identificação de agentes causadores de enfermidades com potencial zoonótico, devem ser valorizadas;

- Os dados clínico-laboratoriais são de suma importância para formação de animais suspeitos para a infecção, no entanto estes dados parcialmente não têm grande expressão para determinar a suspeita de doenças para agentes Anaplasmataceae;

- É considerável que os dados laboratoriais sejam dados complementares para o diagnóstico para alguma doença promovida por estes agentes em felinos domésticos;

- As principais alterações clínicas encontradas nos felinos com as doenças Erliquiose ou Anaplasnose foram letargia, linfadenomegalia, esplenomegalia,

desidratação, perda de peso, edema, dificuldade de locomoção, êmese e afecção ocular.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOTT KC, VUKELJA SJ, SMITH CE, McALLISTER, C.K.; KONKOL, K.A.; O'ROURKE, T.J.; HOLLAND, C.J.; RISTIC, M. Hemophagocytic syndrome: A cause of pancytopenia in human ehrlichiosis. **American Journal of Hematology**; v.38, p.230-234, 1991.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Assessment of Feline Ehrlichiosis in Central Spain Using Serology and a Polymerase Chain Reaction Technique. **New York Academy of Sciences**, v.1026, p.103–105, 2004.

ALLISON, R.W.; LITTLE, S.E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Veterinary clinical pathology**, v.42(2), p. 127-144, 2013.

ALLSOPP, M.T.; LOUW, M.; MEYER, E.C. *Ehrlichia ruminantium*: an emerging human pathogen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1063, p.358–360, 2005.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Feline Ehrlichiosis-review. **Clin. Vet.**, 1999;

ALMOSNY, N.R.P. Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard 1935): **Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase adulta de cães e gatos experimentalmente infectados**. Tese de Doutorado em Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 1998, 202p.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: _____. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros, p. 14-56, 2002.

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

ANDRE, M.R.; HERRERA, H.M.; FERNANDES, S.J.; SOUZA, K.C.M.; GONÇALVES, L.R.; DOMINGOS, I.H.; MACEDO, G.C.; MACHADO, R.Z. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6(6):779-786, 2015.

AYLLON, T.; VILLAESCUSA, A.; TESOURO, M.A.; SAINZ, A. Serology, PCR and culture of Ehrlichia/Anaplasma species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15(suppl 2), p.4-5, 2009.

BAKER, D.C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Veterinary Pathology**, v.24(5), p.449-453, 1987.

BAKKEN, J.S.; DUMLER, S. Human granulocytic anaplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.22(3), p.433-448, 2008.

BANETH, G.; BOURDOISEAU, G.; BOWMAN, D.; BREITSHWERDT, E.; CAPELLI, G.; CARDOSO, L.; DANTAS-TORRES, F.; DAY, M.; DEDET, J.P.; DOBLER, G.; FERRER, L.; IRWIN, P.; KEMPF, V.; KOHN, B.; LAPPIN, M.; MAGGI, R.; NAUCKE, T.; OLIVA, G.; OTRANTO, D.; PENZHOM, B.; PFEFFER, M.; ROURA, X.; SAINZ, A.; SHAW, S.; SHIN, S.; SOLANO-GALLEGU, L.; STRAUBINGER, R.; TRAUB, R.; TREES, A.; TRUYEN, U.; DEMONCEAU, T.; FITZGERALD, R.; GATTI, D.; HOSTETLER, J.; KILMER, B.; KRIEGER, K.; MENCKE, N.; MENDÃO, C.; MOTTIER, L.; PACHNICKE, S.; REES, B.; SIEBERT, S.; STANNECK, D.; MINGOTE, M.T.; VON SIMSON, C.; WESTON, S.; CVBD WORLD FORUM. Vector-borne diseases-constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CBVD World Forum. **Parasites & Vectors**, v.5(55), 2012.

BARNEWALL, R.E.; OHASHI, N.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the human granulocytic ehrlichiosis agent, colocalize with transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. **Infection and Immunity**; v.67, p.2258–2265, 1999.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10(4), p.271–274, 1996.

BEAUFILS, J.P.; BREITSCHWERDT, E.B.; HANCOCK, S.I., HEGARTY, B.C.; MARTIN-GRANEL, J. Ehrlichiose Feline: Identification genetiquede l' agent chez deux chats. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v.37, p.235-238, 2002.

BEAUFILS, J. P., MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P. Ehrlichiose féline: à propos de deux cas. **Bull. Acad. Vét. Fr.**, v.70, p.73- 80, 1999.

BEAUFILS, J. P.; MARTIN-GRANEL, J; JUMELLE, P. Infection du chat par une Ehrlichia sp.: à propos de trois cas. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v.30, p.397-402, 1995.

BERGMANN, M.; ENGLERT, T.; STUETZER, T.; HAWLEY, J.R.; LAPPIN, M.R.; HARTMANN, K. Prevalence of selected rickettsial infections in cats in Southern Germany. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.42, p.33-36, 2015.

BEUGNET, F.; MARIÉ, J. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.298-305, 2009.

BILLETER, S.A.; SPENCER, J.A.; GRIFFIN, B.; DYKSTRA, C.C; BLAGBURN, B.L. Prevalence of Anaplasma phagocytophilum in domestic felines in the United States. **Veterinary Parasitology**, v.147(1–2), p.194–198, 2007.

BIRKENHEUER, A.J.; SPENCER, J.A.; BREITSHCWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni

(Asian genotype) and B. Canis DNA in canine blood samples. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p. 4172-4177, 2003.

BJÖERSDORFF, A.; SVENDENIUS, L.; OWENS, J.H.; MASSUNG, R.F. Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. **Journal of Small Animal Practice**; v.40, p.20–24, 1999.

BOULOY, R.P.; LAPPIN, M.R.; HOLLAND, C.H.; THRALL, M.A.; BAKER, D.; O'NEIL, S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204(9), p.1475-1478, 1994.

BRAGA, I.A.; SANTOS, L.G.F.; MELO, A.L.T.; JAUNE, F.W.; ZILIANI, T.F.; GIRARDI, A.F.; AGUIAR, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of Ehrlichia canis infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22(4), p.470-474, 2013.

BRAGA, I.A.; SANTOS, L.G.F.; RAMOS, D.G.S.; MELO, A.L.T.; MESTRE, G.L.C.; AGUIAR, D.M. Detection of Ehrlichia canis in domestic cats in the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45(2), p.641-645, 2014.

BRAGA, M.S.C.O.; ANDRÉ, M.R.; FRESCHI, C.R.; TEIXEIRA, M.C.A.; MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21(1), p. 37-41, 2012.

BREITHSCHWERDT, E. B. **Canine and feline ehrlichiosis: new developments**. 19th Annual Congress of the ESVD-ECVD, Tenerife, Spain, 2003, p;66-71.

BREITSCHWERDT, E.B.; ABRAMS-OGG, A.C.; LAPPIN, M.R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S.I.; COWAN, S.M.; CLOOTEN, J.K.; HEGARTY, B.C.; HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting Ehrlichia canis-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16(6), p.642-649, 2002.

BREMER, W.G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus. **Veterinary Parasitology**, v.131(1-2), p.95-105, 2005.

BULLER, R.S.; ARENS, M.; HMIEL, S.P.; PADDOCK, C.D.; SUMNER, J.W.; RIKHISA Y.; UNVER, A.; GAUDREAUULT-KEENER, M.; MANIAN, F.A.; LIDDELL, A.M.; SCHMULEWITZ, N.; STORCH, G.A. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. **The New England Journal of Medicine**; v.341; p.148-155, 1999.

BUORO, I. B.; ATWELL, R.B. Feline anemia associated with Ehrlichia-like bodies in three domestic shorthaired cats. **Veterinary Record**, v.125(17), p.434-436, 1989.

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

CHOCHLAKIS, D.; PSAROULAKI, A.; KOKKINI, S.; KOSTANATIS, S.; ARKALATI, E.; KARAGRANNAKI, E.; TSIATIS, K.; TSELENTIS, Y.; GIKAS, A. First evidence of Anaplasma infection in Crete, Greece. Report of six human cases. **Clinical microbiology and infection**, Suppl 2:8-9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02695.x, 2009.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p.863-884, 2003.

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

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

D'AGNONE, A.S. **Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, SP. 2006, 141p.

DAWSON, J.E.; EWING, S.A.; DAVIDSON, W.R. Human monocytotropic ehrlichiosis. In:____ GOODMAN, J.L.; DENNIS, D.T.; SONENSHINE, D.E. (Eds.) **Tick-borne diseases of humans**. ASM Press, Washington, DC; 2005, p.239–257.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the DSB Gene. **Journal Molecular Diagnostic**, v.7, p.504-510, 2005.

DRYDEN, M.W.; PAYNE, P.A. Biology and Control of ticks infesting dogs and cats in North America. **Veterinary Therapeutics**, v.26, 2-16, 2004.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, C.R.; 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 'HE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2145-2165, 2001.

DUMLER, J.S. Anaplasma and Ehrlichia infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**; v.1063, 2005, p.361–373.

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

EBANI, V.V.; BERTELLONI, F. Serological evidence of exposure to Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum in Central Italian healthy domestic cats. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.668-671, 2014.

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

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

ETTINGER.S.J; FELDMAN.E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5 Ed Guanabara koogan. Rio de Janeiro. 2004,p.422- 429.

FERREIRA, R.R.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; AZEVEDO, R.M.M. RODIGUES, 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(1), p.5-8, 2008.

FOLEY, J. E., LEUTENEGGER, C.M.; DUMLER, J.S.; PEDERSEN, N.C.; MADIGAN, J.E. Evidence for modulated immune response to Anaplasma phagocytophila sensu lato in cats with FIV-induced immunosuppression. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26(2), p.103-113, 2003.

FOLEY, J.E.; LEUTENEGGER, C.M.; STEPHEN DUMLER, J.; PEDERSEN, N.C.; MADIGAN, J.E.; Evidence for modulated immune response to Anaplasma

phagocytophila sensu lato in cats with FIV-induced immunosuppression. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 26(2), p.103-113, 2003.

GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v.3(1), p.33, 2010.

GHAFFAR, M.V.; AMER, S.A. Prevalence and first molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic anaplasmosis, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt. **Journal of Advanced Research**, v.3, p.189-194, 2012.

GOODMAN, J.L. Human granulocytic anaplasmosis (ehrlichiosis). In: GOODMAN, J.L.; DENNIS, D.T.; SONENSHINE, D.E. **Tick-borne diseases of humans**. Washington, DC: ASM Press: 2005, p.218-238.

HAMEL, D.; BONDARENKO, A.; SILAGHI, C.; NOLTE, I.; PFISTER, K. Seroprevalence and bacteremia of *Anaplasma phagocytophilum* in cats from Bavaria and Lower Saxony (Germany). **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.125(3-4), p.163-167, 2012.

HARRUS, S.; AROACH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, p. 247-250, 1997.

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

HARVEY, J.W. *Anaplasma platys* infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). In: GREENE, G.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Elsevier, 4th, 2012, p. 257.

HARVEY, J.W. Thrombocytotropic anaplasmosis (*A. platys* infection). In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd edição. St Louis(MO): Saunders Elsevier, 2006, p.229-231.

HEIKKILÄ, H.M.; BONDARENKO, A.; MIHALKOV, PFISTER, K.; SPILLMANN, T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, p.62-66, 2010.

HERGARTY, B.C.; QUROLLO, B.A.; THOMAS, B.; PARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; BEALL, M.J.; THATCHER, B.; BREITSCHWERDT, E.B. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasites & Vectors**, v.8, p. 320-328, 2015.

HINRICHSEN, V. L.; WHITWORTH, U.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; MATHER, T.N. Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218(7), p.1092-1097, 2001.

IBGE. População de animais de estimação no Brasil em 2013. Elaboração Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET). 79ª Reunião Ordinária - Auditório Maior - MAPA, Brasília/DF, 2015, 7 p.

INOKUMA, A.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Veterinary Parasitology**, n.110, p.145-152, 2002.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M.; KELLY, P.J.; JACOBSON, L.A.; FOURNIER, P.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; BROUQUI, P. Molecular detection of a New *Anaplasma* Species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from South Africa. **Journal Clinical Microbiology**, p. 2934-2937, 2005.

INOKUMA, H.; RAOAUT, D.; BROUQUI, P. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Jpn. **Journal Clinical Microbiology**, v.38(11), p.4219-4221, 2000.

KIDD, L.; BREITSCHWERDT, E.B. Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v.25, p.742-775, 2003.

LAPPIN, M.R., BREITSCHWERDT, E.B. Ehrlichia spp infection (feline monocytotropic ehrlichiosis). In: _____ GREENE, C.E. (ed): **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012, p. 238-241.

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

LEWIS, G. E., JR.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; JOHNSON, A.J. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with Ehrlichia equi, etiologic agent of equine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.36(1), p.85-88, 1975.

LIMA, M.L.F.; SOARES, P.T.; RAMIS, C.A.N.; ARAUJO, F.R.; RAMOS, R.A.N.; SOUZA, I.I.F.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p. 381-385, 2010.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, p.1121-1140, 2010.

MADIGAN, J. E., Y. RIKIHISA; PALMER, J.E.; DeROCK, E.; MOTT, J. Evidence for a high rate of false-positive results with the indirect fluorescent antibody test for Ehrlichia risticii antibody in horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.207(11), p.1448-1453, 1995.

MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.S.; PUSTERLA, J.B.; DEROCK, E.; LAWLER, S.P. Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report. **Equine Veterinary Journal**, v.32(4), p.275-279, 2000.

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

MAIA, C.; RAMOS, C.; COIMBRA, M.; BASTOS, F.; MARTINS, A.; PINTO, P.; NUNES, M.; VIEIRA, M.L.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Bacterial and protozoal agentes of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from Southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v.7, p.115-122, 2014.

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

MATTHEWMAN, L. A.; KELLY, P.J.; WRAY, K.; BRYSON, N.R.; RYCROFT, A.N.; RAOULT, D.; MAHAN, S.M. Antibodies in cat sera from southern Africa react with antigens of *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v.138(15), p.364-365, 1996.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, v.21(1), p.167-174, 2005.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79(4), p.325-39, 1998.

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

NEER, T.M. **Canine Monocytic and Granulocytic Ehrlichiosis**. In **Greene**. CE 2^aed. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, PA: WB Saunders. 1998, p.139-147.

NEER, T.M.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection. In:___ GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. (ed.) Canada, Saunders Elsevier. 2006, p.203-232.

NICHOLSON, W.L.; ALLEN, K.E.; MCQUISTON, J.H.; Breitschwerdt, E.B.; Little, S.E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v.26(4), p.205-212, 2010.

O'CONNOR, T.P.; HANSCOM, J.L.; HEGARTY, B.C. GROAT, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Comparison of na indirect immunofluorescence assay, Western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. **American Journal of Veterinary Research**, v.67(2), p.206-210, 2006.

OLIVEIRA, L.S. Investigação Molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos em Viçosa/ MG. 2008. 75f. Viçosa – MG. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária), UFV, Minas Gerais. 2008.

OLIVEIRA, L.S.; MOURÃO, L.C.; OLIVEIRA, K.A.; AGOSTINI, M.M.; OLIVEIRA, A.C.; ALMEIDA, M.R.; FIETTO, J.L.R.; CONCEIÇÃO, L.G.; FILHO, J.D.R.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.15 (suppl.2), p. 53-54, 2009.

ORTUÑO, A.; GAUSS, C. B. L.; GARCIA, F.; GUTIERREZ, J. F. Serological Evidence of Ehrlichia spp. Exposure in Cats from Northeastern Spain. **Journal Veterinary Medicine B**, v.52, p.246–248, 2005.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. **Parasites & Vectors**, v.3(2), 2010.

PAROLA, P.; VOGELAERS, D.; ROURE, C.; JANBON, F.; RAOULT, D. Murine typhus in travelers returning from Indonesia. *Emerging Infectious Disease Journal*, v.4, p. 677-680, 1998.

PAROLA, P. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.27; p.297–304, 2004.

PAROLA, P.; RAOULT, D. **Rickettsial Diseases**. New York London Informa Healthcare, 2007, p.179.

PEAVY, G. M.; HOLLAND, C.J.; DUTTA, S.K.; SMITH, G.; MOORE, A.; RICH, L.J.; LAPPIN, M.R.; RICHTER, K. Suspected ehrlichial infection in five cats from a household. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.210(2), p.231-234, 1997.

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, 2006, p.110-117.

POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, S.M. et al. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal Medicine Microbiology**; v.47; p.235–251, 1998.

PORTAL G1. Doença transmitida por carrapatos mata 26 pessoas na China. Acesso em 2013, novembro 21. Disponível em: [http:// http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2010/09/doenca-transmitida-por-carrapatos-mata-26-pessoas-na-china.html](http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2010/09/doenca-transmitida-por-carrapatos-mata-26-pessoas-na-china.html).

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES, J.R.D.; 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 Parasitology Veterinary**, v.18(1), p.58-62, 2009.

RIKIHISA, Y.; STILLS, H.; ZIMMERMAN, G. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in a macrophage cell line. **Journal Clinical Microbiology**; v.29, p.1928–1933, 1991.

RIOCHE, M. Bovine rickettsiosis in Senegal. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v.19; p.485–494, 1966.

RYMASZEWSKA, A.; GREYDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinary Medicine**, v53 n11, 573–584, 2008.

SANTAREM, V.A.; LAPOY, C.B.; FARIAS, M.R. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*)-like inclusion bodies in platelets of a cat. **Colloquium Agrariae**. v.1(2), p. 60-66, 2005.

SANTIAGO, T.A. **Enfermedades Vectoriales en Gatos de la Comunidad de Madrid: Estudio Serológico, Molecular y Epidemiológico de la Infección por Ehrlichia spp, Anaplasma spp, Neorickettsia spp, Leishmania spp y Bartonella spp**. 2010. 319 f. Tese Doutorado - Universidad Complutense De Madrid Facultad de Veterinaria - Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Madrid, 2010.

SASAKI, H.; ICHIKAWA, Y.; SAKATA, Y.; ENDO, Y.; NISHIGAKI, K.; MATSUMOTO, K.; INOKUNA, H. Molecular survey of *Rickettsia*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* infection of domestic cats in Japan. **Ticks and Tick-borne diseases**, v.3, p.307-310, 2012.

SAVIDGE, C.; EWING, P.; ANDREWS, J.; AUCCOIN, D.; LAPPIN, M.R.; MOROFF, S. *Anaplasma phagocytophilum* infection of domestic cats: 16 cases from the northeastern USA. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.18(2), p.85-91, 2015.

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

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

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

SOUSA, V.R.F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular e cães naturalmente infectados por Ehrlichia canis e Anaplasma platys**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2006, 58p.

SPADA, E.; PROVERBIO, D.; GALLUZZO, P.; PEPA, A.D.; PEREGO, P.; DE GIORGI, G.B.; FERRO, E. Molecular study on selected vector-borne infections in urban stray colony cats in northern Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.16(8), p. 684-688, 2014.

STUBBS, C. J.; HOLLAND, C.J.; REIF, J.S. Feline ehrlichiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v.22, p.307-17, 2000.

TABAR, M. D.; ALTET, L.; FRANCINO, O. SANCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**, v.151(2-4), p.332-336, 2008.

TAMÍ, I. 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 de Salud Pública**, v.16, n. 5, p. 345–349, 2004.

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

WALLS, J.L.; AGUERRO-ROSENFELD, M.; BAKKEN, J.S.; GODDMANN, J.L.; HOSSAIN, D.; JOHNSON, R.C.; DUMLER, J.S. Inter- and Intralaboratory Comparison of *Ehrlichia equi* and Human Granulocytic Ehrlichiosis (HGE) Agent Strains for Serodiagnosis of HGE by the Immunofluorescent-Antibody Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2968-2973, 1999.

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

YAMANAKA, A. R.; BENETTI, A. H.; DAROLD, G, M.; IGARASHI, M.; MURARO L, S.; ALARCON, L, F.; MOURA, S. T.; DUTRA A, A.; GAZETA, G, S. Soroprevalência de Anaplasma Phagocytophilum em felinos domésticos atendidos no hospital veterinário da Universidade de Cuiabá - MT. In: 35 Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2014, Belo Horizonte. ANAIS 35º ANCLIVEPA, 2014.

ZEIDNER, N.S.; DOLAN, M.C.; MASSUNG, R.; PIESMAN, J.; FISH, D. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis suppresses IL-2 and IFN γ production and promotes an IL-4 response in C3H/HeJ mice. **Parasite Immunology**, v,22, p.581–588, 2000.

ZOBBA, R.; ANFOSSI, A.G.; VISCO, S.; SOTGIU, F.; DEDOLA, C.; PINNA PARGAGLIA, M.L.; BATTILANI, M.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Cell tropismo and molecular epidemiology of Anaplasma platys-like strains in cats. **Ticks and ticks-borne diseases**, v.6(3), p.272-80, 2015.

ANEXO 1

FICHA CLÍNICA DO PACIENTE FELINO

Nome:	Idade:	Sexo:	Data:
Proprietário:	Raça:		
Registro:			

Casa Apartamento

Observações de Histórico e anamnese:

--

Animal apresentou as seguintes doenças (Sim ou Não):

FIV e/ou FELV:
Hemobartonelose (Mycoplasmosse felina):
Babesiose:

PERFIL CLÍNICO:

Alterações clínicas específicas:

Alterações	Sim	Não	Anotações
Febre	()	()	
Perda de Peso	()	()	
Letargia	()	()	
Edema (local)	()	()	
Hemorragia (local e classificação)	()	()	
Dor articular e dif. de locomoção	()	()	
Êmese	()	()	
Afecção Ocular (classificação)	()	()	
Esplenomegalia (dor e aumento de tamanho)	()	()	
Linfadenopatia (local e aspecto)	()	()	
Sensibilidade a palpação (local)	()	()	
Desidratação (Turgor cutâneo)	()	()	
Mucosas pálidas (TPC)	()	()	
Presença de Vetores(carrapatos,pulgas,piolhos)	()	()	

Incluído?:

Suspeita Clínica:

ANEXO 2

FICHA LABORATORIAL DO PACIENTE

PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO:			
Alterações hematológicas e bioquímicas:			
Alterações	Sim	Não	Anotações
Anemia Normocítica Normocrômica	()	()	
Trombocitopenia	()	()	
Leucopenia	()	()	
Neutrofilia absoluta	()	()	
DNNE	()	()	
Linfocitopenia absoluta	()	()	
Monocitose absoluta	()	()	
Pancitopenia	()	()	
Presença de Inclusões citoplasmáticas (local)	()	()	
Hiperproteinemia	()	()	
Hiperglobulinemia	()	()	
Hipoalbuminemia	()	()	