

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CÂMPUS DE PATOS-PB

ALDENISE CAROLINE DA SILVA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CASOS SUSPEITOS DE *Anaplasma platys* EM  
FELINOS DOMÉSTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO  
UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

PATOS - PB

2019

ALDENISE CAROLINE DA SILVA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CASOS SUSPEITOS DE *Anaplasma platys* EM  
FELINOS DOMÉSTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO  
UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Médico Veterinário pela Universidade  
Federal de Campina Grande

Antônio Fernando de Melo Vaz  
Orientador

PATOS - PB  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

S586d

Silva, Aldenise Caroline da

Diagnóstico molecular dos casos suspeitos de *Anaplasma platys* em felinos domésticos atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Campina Grande / Aldenise Caroline da Silva. – Patos, 2019.

28f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz.”

Referências.

1. Anaplasmosse. 2. Gatos. 3. PCR. I. Título.

CDU 576.8:619

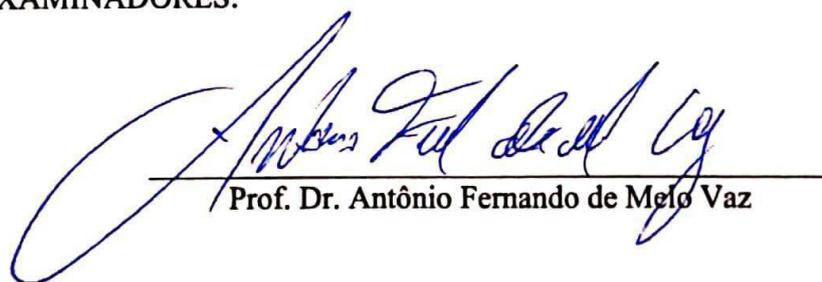
ALDENISE CAROLINE DA SILVA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CASOS SUSPEITOS DE *Anaplasma platys*  
EM FELINOS DOMÉSTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO  
UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

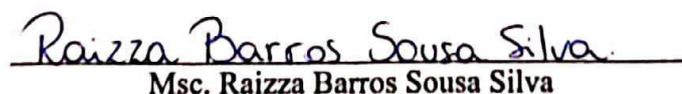
Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Médico Veterinário  
pela Universidade Federal de Campina  
Grande.

APROVADO EM 17/06/2019

EXAMINADORES:

  
Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz

  
Msc. Gilzane Dantas Nóbrega

  
Msc. Raizza Barros Sousa Silva

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente em minha vida e ser meu sustento e fortaleza.

Aos meus pais, **Cícero** e **Albaneide**, pelo amor, criação e por todo esforço e carinho. Por acreditarem no meu sonho e deixar seguir meu caminho, apesar das dificuldades. Às minhas irmãs, **Albanise** e **Aldilene**, que sempre foram presentes com incentivo, conversas, brincadeiras e por compartilharem tanto amor comigo.

Ao meu esposo, **Fernando**, por ser meu maior incentivador e me apoiar em todas as minhas decisões. Apesar das dificuldades, nunca me deixou parar e construiu tudo comigo. A minha filha, **Alícia**, meu maior amor e a fonte de toda minha coragem e força. Minha luta e todas as minhas vitórias serão sempre por ela e para ela.

A minha sogra, **Elianeide**, pela ajuda e acolhimento. Aos familiares, **tias/tios** e **primas/primos** e ao cunhado **Phellipe**, que me apoiaram nessa caminhada de diversas maneiras.

Aos amigos, que me incentivaram durante esse curso, em especial **Jhonatha (Bob)**, que desde a escola mantêm essa amizade/irmandade firme e forte apesar da distância. Obrigada pelas palavras, pelo carinho e pela força.

Ao grupo “amigo baby”, **Rayra, Denise, Angélica, Moema, Sheyla, Joyce, Katianny, Laysa, Michel** e **Nayadjala**, pela convivência e amizade. Apesar da distância, não se afastaram, as surpresas continuaram e dividiram a guarda da minha filha quando precisei. Saudade de todos.

As melhores vizinhas, **Katianny**, pelas conversas, apoio e amizade que facilitaram ainda mais minha existência longe da família, e **Nathália**, que apesar do pouco tempo de convivência, me apoiou e compartilhou conversas e amizade. As melhores companheiras de casa, **Diana** e **Moema**, pela amizade e convivência. A todas, pelo amor e cuidado que também tiveram pela minha filha e por fazerem me sentir acolhida e amada.

Aos residentes da patologia clínica: **Samuel**, pela paciência e ensinamentos; **Sheyla**, pela grande amizade, conversas (fofocas) e por compartilhar seus conhecimentos com mansidão; **Higina**, pela amizade, ensinamentos, pelo apoio em todos os momentos e por me dar uma grande ajuda nessa etapa final. Com vocês aprendi muito sobre patologia e a vida. Aos técnicos e veterinários, **Gilzane** e **Francisco**, pelos conhecimentos divididos, por terem prazer em ensinar e pela convivência. E a todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Patologia Clínica (**André, Áthila, Dani, Vitória, Andriele, Neide**) por ser uma grande família e por tornar o ‘aprender’, um momento de descontração e felicidade.

Ao professor **Fernando Vaz**, pelos ensinamentos passados em sala de aula e pelos conselhos ofertados para enriquecimento pessoal e profissional. Por ser um exemplo de pessoa, ser prestativo sempre e com boa vontade. Por aceitar ser meu orientador e ajudar a alavancar meus conhecimentos.

A todos os professores que passaram por minha vida e me ensinaram muito do que sei hoje, por possuírem uma das profissões mais honradas do mundo e se dedicarem a formar cidadãos. Dedico a todos, que realmente ensinam, meu sucesso nessa caminhada. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

Aos amigos conquistados na turma 2014.2, pela acolhida, conversas e brincadeiras.

A **Raizza**, pela disponibilidade e auxílio na elaboração do TCC. Por estar sempre acessível e me ensinar com paciência e boa vontade e por aceitar ser parte da minha banca avaliadora. Sei que sem você, parte deste trabalho não seria possível.

As minhas filhas peludas, **Meg** (*in memoria*) e **Mel**, e a todos os amores peludos da minha vida, **Bob** (*in memoria*), **Belinha**, **Shayene**, que foram fonte do meu amor pelos animais e pela profissão.

A todos que estiveram presentes comigo ao longo dessa caminhada me incentivando e auxiliando direta ou indiretamente, muito obrigada!

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ser base em minha vida, aos meus pais e irmãs pela ajuda e apoio, ao meu esposo por ser meu maior incentivador, a minha filha que é minha razão e força e ao meu orientador por aceitar o convite e pelas palavras de apoio.*

## RESUMO

**da SILVA, ALDENISE CAROLINE. Diagnóstico molecular dos casos suspeitos de *Anaplasma platys* em felinos domésticos atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Campina Grande. UFCG, 2019. 28p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária).**

A anaplasmose é uma das principais hemoparasitoses que afeta cães e gatos, sendo mais relatada em regiões tropicais. Poucos trabalhos publicados descrevem em felinos as suas principais alterações clínicas e hematológicas, como também, a positividade da enfermidade através da PCR. O presente estudo teve como finalidade, a confirmação de casos suspeitos de anaplasmose felina, através da PCR, no período de abril de 2018 a fevereiro de 2019, após evidenciação de mórulas em plaquetas de 32 gatos atendidos no HVU-UFCG. Os seguintes parâmetros foram utilizados: idade, sexo, raça, e as principais alterações hematológicas foram avaliadas. As amostras de sangue total com anticoagulante EDTA 10% foram analisadas em aparelho automatizado Poch 100-iv Diff (Sysmex, Brasil) e o diferencial leucocitário realizado em microscópio nos aumentos de 400 e 1000 vezes. Encaminharam-se as alíquotas para a realização da nested PCR que confirmou a presença de *Anaplasma platys* em seis amostras. Nos seis animais positivos, nenhuma alteração eritrocitária com relevância clínica foi observada. Em dois felinos (33,3%) constatou-se leucocitose e dois (33,3%) apresentaram trombocitopenia. A nPCR é de fundamental importância para a confirmação do diagnóstico de anaplasmose naqueles animais que apresentaram inclusões basofílicas plaquetária no esfregaço sanguíneo. O estudo a seguir, é o primeiro diagnóstico molecular de *A. platys* em felinos, realizado no estado da Paraíba.

**Palavras-chave:** Anaplasmose, Gatos, PCR.

## ABSTRACT

**da SILVA, ALDENISE CAROLINE. Molecular diagnosis of suspected cases of *Anaplasma platys* in domestic cats treated at the University Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande.** UFCG, 2019. 28p. (Course Completion Work in Veterinary Medicine).

Anaplasmosis is one of the major hemoparasites that affects dogs and cats, and it's more commonly reported in tropical regions. Few published papers describe in felines their main clinical and hematological alterations, as well as the positivity of the disease through PCR. The present study had the purpose of confirming suspicious cases of feline anaplasmosis through PCR, from April 2018 to February 2019, after evidence of platelet morulae from 32 cats treated at HVU-UFCG. Parameters of age, sex and race, as well as the main hematological alterations were evaluated. Samples of whole blood with anticoagulant EDTA 10% were analyzed in automated apparatus Poch 100-iv Diff (Sysmex, Brazil) and the differential realized in microscope in the magnification of 400 and 1000 times. The aliquots were run for the nested PCR that confirmed the presence of *Anaplasma platys* in six samples. In the six positive animals, no clinically relevant erythrocyte abnormalities were observed. In two cats (33.3%) leukocytosis was observed and two (33.3%) presented thrombocytopenia. The nPCR is of fundamental importance for the confirmation of the diagnosis of anaplasmosis in those animals that presented basophilic platelet inclusions in the blood smear. The following study is the first molecular diagnosis of *A. platys* in felines, conducted in the state of Paraíba.

**Key-words:** Anaplasmosis, Cats, PCR.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1-</b> Inclusão basofílica em plaqueta de felino doméstico.....	21
<b>Figura 2-</b> Amplificação do fragmento de 478 pb do gene 16S rRNA de <i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Anaplasma</i> sp. (PM – Peso molecular. CN – Controle negativo. CP – Controle positivo).....	23
<b>Figura 3-</b> Amplificação do fragmento de 384 pb do gene 16S rRNA de <i>A. platys</i> .....	24

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1-</b> Tabela 1: Concentração de componentes do Mix da <i>nested</i> PCR para identificação do gênero e espécie.....	19
<b>Tabela 2-</b> Sequência dos primers para o gene 16S rRNA usados para identificar <i>A. platys</i> na nPCR.....	20
<b>Tabela 3-</b> Valores referentes às alterações hematológicas dos animais testados para <i>A. platys</i> .....	22

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 ANAPLASMOSE .....	13
2.2 ETIOLOGIA .....	13
2.3 PATOGENIA .....	14
2.4 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS .....	14
2.5 DIAGNÓSTICO.....	15
2.5.1 Esfregaço sanguíneo .....	15
2.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	15
2.5.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	15
2.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase .....	16
2.6 TRATAMENTO .....	17
2.7 ANAPLASMOSE FELINA .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 LOCAL DO ESTUDO .....	18
3.2 EXAME HEMATOLÓGICO.....	18
3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	19
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O número de casos de felinos com presença de mórulas em plaquetas na Clínica Médica de Pequenos Animais (CMPA), do Hospital Veterinário Universitário Prof. Dr. Ivon Macêdo Tabosa (HVU) em Patos – PB, tem apresentado considerado crescimento.

*Anaplasma platys*, anteriormente conhecido por *Ehrlichia platys*, é um micro-organismo Gram negativo, o qual obrigatoriamente parasita as plaquetas e que se apresenta na forma de mórulas em sangue periférico. Em cães causa trombocitopenia cíclica, sendo mais acentuada em casos graves. Nos gatos, existem poucos relatos sobre a infecção e a forma de transmissão ainda é incerta. Suspeita-se que o vetor seja o *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato marrom) por ser o responsável pela transmissão para cães.

No Brasil, foram relatadas infecções em gatos pela *A. platys* em Pernambuco, Distrito Federal e no Rio de Janeiro, havendo confirmação pela nested PCR (nPCR). O diagnóstico no presente estudo foi dado a partir a visualização de mórulas em plaquetas e a confirmação se deu por nPCR. A pesquisa sobre o agente torna-se bastante relevante, uma vez que os animais podem servir como fonte de infecção para outros animais e seres humanos, como relatados na Venezuela em duas mulheres, mostrando assim, um potencial zoonótico da doença.

O presente trabalho teve por objetivo realizar nested PCR para confirmar os casos suspeitos de anaplasmosose em gatos atendidos no HVU/UFCG no período de abril de 2018 a fevereiro de 2019. Este é o primeiro estudo molecular que demonstra a presença de *A. platys* em felinos no estado da Paraíba.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ANAPLASMOSE

*Anaplasma platys*, anteriormente conhecida como *Ehrlichia platys*, é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à ordem *Rickettsiales*, que teve sua primeira identificação em 1978 ao ser descrita por Harvey et al. (1978) em cães da Flórida, determinando como a causadora da Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC). Acredita-se que a Anaplasmoze é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que também é responsável pela transmissão de *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, através de secreção salivar. Após a década de 1970 foi relatada na França, Grécia e na Espanha inclusões plaquetárias em esfregaços sanguíneos de cães (ARRAGA-ALVARADO et al., 2003).

No ano de 1997, estudos conduzidos por Inokuma, Raoult e Brouque (2000) demonstraram a presença de *A. platys* em carrapatos coletados de cães de vida livre na Ilha de Okinawa no Japão. Geralmente as infecções por *A. platys* são relatadas geograficamente onde existem infecções por *E. canis*, ocorrendo assim infecção por múltiplos microrganismos que supostamente são transmitidos pelo mesmo vetor (KORDICK et al., 1999; SUKSAWAT et al., 2001).

No Brasil, a identificação de *A. platys* é realizada através da observação de mórulas em plaquetas no esfregaço sanguíneo ou por método sorológico (SOARES et al., 2006; RAMOS et al., 2009); no entanto, devido a baixa especificidade e sensibilidade, esses tipos de diagnóstico não determinam a prevalência do patógeno e em esfregaço sanguíneo, pode ser confundido com *E. canis* (RIKIHISA et al., 2000; TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004).

### 2.2 ETIOLOGIA

As riquetsias são bactérias Gram negativas intracelulares obrigatórias, transmitidas por artrópodes (BREITSCHWERDT, 2014). Esses micro-organismos causadores da anaplasmoze são da ordem *Rickettsiales*, família Anaplasmatacea, do gênero *Anaplasma*, denominadas de *A. platys* a partir de 2001, quando Dumler et al. propôs uma reorganização dos gêneros (DUMLER et al., 2001). *A. platys* é relatada em todo território brasileiro, porém poucas publicações são descritas.

Os micro-organismos do gênero *Anaplasma*, através de um ciclo enzoótico, permanecem no ambiente entre animais selvagens e carrapatos, tendo assim a capacidade de

infectar seres humanos e animais domésticos, principalmente quando ocorre desequilíbrio ambiental devido a intervenções humanas e naturais (RIKIHISA, 2003). Este agente foi encontrado em duas mulheres na Venezuela, que após retirarem carrapatos de seus corpos, desenvolveram sinais clínicos e hematológicos sugestivos da doença (ARRAGA-ALVARAGO et al., 2014).

### 2.3 PATOGENIA

Após a aderência do carrapato vetor, *R. sanguineus*, no animal, ocorre o repasto sanguíneo. O vetor necessita ficar fixado por algumas horas para o repasto, durante esse período, a temperatura do carrapato se eleva e, assim, há a ativação do agente bacteriano que irá se multiplicar e, dessa forma, suscitar a infecção. Na saliva do carrapato existem componentes que inibem resposta imunológica do tipo Th1, auxiliando resposta Th2 facilitando assim a infecção, onde, *A. platys* multiplica-se dentro da plaqueta formando as mórulas (AGUIAR, 2015). Existem diversos corpos elementares dentro de cada mórula, que se rompem e liberam os agentes que infectam novas células ocasionando repetição do ciclo (SANCHES, 2015).

### 2.4 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

O curso da infecção varia de acordo com sua intensidade. No começo, os animais com *A. platys* são considerados assintomáticos, ou seja, apresentam uma infecção subclínica (DUMLER et al., 2001; BEAUFILS et al., 2002; MATEI et al., 2016). No entanto, após a detecção em microscópio de *A. platys* em cães na França em 1980, foram observados graves sinais clínicos como hipertermia, letargia, anorexia, e às vezes, sinais digestivos e distúrbios hemorrágicos (BEAUFILS, et al., 2002). Comumente esses animais também apresentam perda de peso e depressão sendo a hemorragia, um sinal de trombocitopenia grave (DOWSON et al., 1991; DAGNONE, 2002 apud MACHADO; DAGNONE; SILVA, 2010).

A infecção por *A. platys*, após 8 a 15 dias de incubação no cão, caracteriza-se por ser uma parasitemia cíclica plaquetária, seguida de trombocitopenia e linfadenomegalia difusa (DAWSON et al., 1991). Os achados laboratoriais encontrados por Beaufils et al. (2002) incluíram trombocitopenia, monocitose e, como teste complementar, vários animais foram testados e demonstraram soropositividade para *A. platys* na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). No esfregaço sanguíneo durante a infecção crônica, são observadas poucas

plaquetas parasitadas e trombocitopenia menos severa (FRENCH et al., 1983 apud MACHADO; DAGNONE; SILVA, 2010; DOWSON et al., 1991).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

### 2.5.1 Esfregaço sanguíneo

O esfregaço sanguíneo é o diagnóstico parasitológico mais utilizado, onde são observadas mórulas dentro do citoplasma de plaquetas quando se analisa amostra de sangue total ou camada leucocitária. Nesse último caso, o sangue com EDTA é centrifugado e então se obtêm a separação das camadas de plasma, leucócito e eritrócito. É feito um esfregaço tênue com a camada leucocitária, corado com Giemsa, Wright ou panótico. Dessa forma torna-se mais fácil a visualização de mórulas do agente em plaquetas (DOWSON et al., 1991; DUMLER et al., 2001; INOKUMA et al., 2001).

### 2.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI identifica os anticorpos para antígenos específicos de *Rickettsia*, no entanto não diferencia infecção das diferentes espécies nas amostras. De acordo com Lester (2005), este teste é utilizado para identificar a presença de anticorpos atuantes contra antígenos de superfície. Ocorre primeiramente uma reação onde forma-se o complexo antígeno-anticorpo e então utiliza-se um marcador FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), ligando-se ao complexo, o que permite a observação desta reação em microscópio de imunofluorescência.

Apesar de ser bastante específico e ter alta sensibilidade, ocorrem alguns resultados falso-positivos pela presença de anticorpo após o tratamento e cura. Também pode haver resultado falso-negativo se o sangue for coletado no início da doença, pois a presença de IgG só é detectada após 8 a 10 dias da infecção, fazendo-se necessário a realização de dois testes com intervalo de 4 a 8 semanas para detectar a variação de IgG presente no animal (FERRÃO et al., 2006).

### 2.5.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O teste de ELISA é também utilizado para o diagnóstico de anaplasose. É um teste de fácil leitura, de baixo custo, rápido e auxilia no diagnóstico clínico, no entanto o resultado

se apresenta apenas como positivo ou negativo (SANCHES, 2015). Tem grande especificidade e sensibilidade, assim como a RIFI, tendo ainda mais facilidade de realização e apresentando resultados mais rápidos (MASSUNG et al., 1998; INOKUMA et al., 2001; MACHADO; DAGNONE; SILVA, 2010). Porém, foi descrita uma reação cruzada em cães PCR-positivos para *A. platys*, analisados com ELISA comercial para confirmação de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum* (FERREIRA et al., 2008).

#### 2.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase – PCR resulta em amplificação do genoma de DNA do parasita e é o exame de melhor diagnóstico, por fazer a detecção do DNA do agente antes de ser formada a mórula ou da soro conversão. Para a detecção de *A. platys* é geralmente utilizado o gene 16S rDNA, a partir do protocolo descrito por INOKUMA et al. (2001). Esse teste é considerado mais rápido e preciso quando comparado aos testes sorológicos. Todavia, a PCR exige a caracterização molecular e o sequenciamento dos produtos dos testes, para que tenha um resultado de maior sensibilidade (DAGNONE A. S., 2006).

Diversas formas de realização da PCR são descritas. A PCR convencional é mais simples, apesar de sua sensibilidade alta, e demonstra resultados qualitativos (positivo ou negativo) (DINIZ; GOMES; GOMEZ, 2018). Essa técnica consiste na replicação de forma exponencial de material genético, a partir de um fragmento específico de DNA, por meio da enzima DNA polimerase e de iniciadores (primers), que faz a síntese complementar de uma sequência específica de DNA (MORITA et al., 2003; VALONES et al., 2009). Após o término da reação, realiza-se a eletroforese em gel de agarose e analisa e as bandas coradas (moléculas de DNA) em transiluminador UV.

Há também a RT-PCR (*Reverse Transcription*), que permite o estudo da expressão gênica, ou seja, a avaliação das proteínas produzidas em um determinado tecido. A RT-PCR também pode ser utilizada para o diagnóstico de microrganismos que possuem o RNA como material genético. Essa técnica consiste na análise do RNA, criando um DNA complementar (cDNA) a começar de um RNA mensageiro. A conversão de RNA em cDNA é realizada pela enzima transcriptase reversa e tem como vantagem proporcionar maior resistência a degradação. (DINIZ; GOMES; GOMEZ, 2018). O cDNA poderá ser amplificado pelo método convencional ou em tempo real.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) permite a quantificação de DNA e RNA com maior eficácia e sensibilidade, possui menor probabilidade de contaminação, produz

mais cópias com maior facilidade e é mais preciso (MORILLO et al., 2003; VALONES et al., 2009). Quanto maior a quantidade de material genético na amostra, menor é o número de ciclos necessários para capturar o sinal fluorescente na reação. Se for estabelecida uma curva de calibração da molécula alvo, o resultado apresenta uma quantidade absoluta de DNA (DINIZ; GOMES; GOMEZ, 2018).

A Nested PCR consiste na realização de duas etapas de PCR seguidas de eletroforese para conferência das bandas positivas, e onde utiliza o produto da primeira reação como DNA alvo para a segunda. Foi idealizado pela primeira vez na década de 1996, para o agente *A. platys* e se mostrou o método mais sensível e específico para o diagnóstico do mesmo. Sua sensibilidade é 10 vezes maior que a PCR convencional, e possibilita a detecção do agente mesmo com um baixo nível de parasitemia plaquetária. A aplicação desta técnica se mostrou mais eficiente para a detecção de TCIC tanto na fase aguda como na crônica, e também para o diagnóstico diferencial de trombocitopenia em cães (CHANG; PAN, 1996).

## 2.6 TRATAMENTO

Os antibióticos de eleição para o tratamento da anaplasmoze são as tetraciclina e seus derivados (por exemplo, a doxiciclina), pois possuem maior eficácia na eliminação do agente. Esta doença limita a eficiência do tratamento devido à localização da *A. platys* que está presente dentro de plaquetas (DOWSON et al., 2001; MACHADO; DAGNONE; SILVA, 2010). De acordo com Breitschwerdt (2014), as doses indicadas são 22mg/kg de tetraciclina TID por 14 dias ou 5mg/kg de doxiciclina BID durante 14 dias por via oral.

Pode ser usado ainda o dipropionato de imidocarb que demonstra ter bastante eficácia, principalmente quando há infecção simultânea por *Babesia* sp (DAGNONE et al., 2004 apud MACHADO; DAGNONE; SILVA, 2010).

## 2.7 ANAPLASMOSE FELINA

Poucos relatos foram feitos até hoje sobre a infecção por *A. platys* em felinos domésticos. Santarém, Laposy e Farias (2005) relataram pela primeira vez um caso de infecção por *A. platys* na cidade de Presidente Prudente, São Paulo, em uma gata que apresentava mórulas intraplaquetárias em 7% de suas plaquetas, anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia.

Apenas em 2007 houve o diagnóstico molecular através de PCR, na amostra de sangue de um felino de aproximadamente 10 anos de idade atendido em Recife, Pernambuco. Foram visualizadas inicialmente mórulas em plaquetas e o animal apresentava anorexia, apatia, anúria e constipação, mas nenhum sinal clínico foi associada a infecção por *A. platys* (LIMA, et al., 2010).

Apesar de ser bastante específico, a PCR pode apresentar alguns resultados negativos, porém não se deve descartar de imediato a infecção do animal. Resultados negativos podem decorrer da baixa quantidade do organismo na circulação, tanto após tratamento com antibiótico, como por progressão da infecção (LITTLE, 2010).

A transmissão para o gato não é confirmada em nenhum dos trabalhos já publicados, porém acredita-se que o carrapato marrom (*R. sanguineus*) que é o principal transmissor do patógeno para os cães, seja também o responsável pela infecção dos felinos domésticos (CORREA, 2011). Entende-se também que a infecção do felino pode ser dada através das pulgas, uma vez que são vetores presentes em gatos com suspeita de *Ehrlichia* sp. (PEAVY et al. 1997 apud CORREA et al. 2011)

Em alguns casos acredita-se que o felino ao caçar roedores, entre em contato com artrópodes infectados com espécies de *Ehrlichia* spp. e dessa forma se infectando (KAWAHARA et al. 1993, NICHOLSON et al. 1998).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL DO ESTUDO**

As amostras foram analisadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV), através da avaliação do hemograma e pesquisa de hemoparasitas, e no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), através da realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ambos pertencentes ao Hospital Veterinário Universitário Prof. Dr. Ivon Macêdo Tabosa do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da UFCG, campus Patos.

#### **3.2 EXAME HEMATOLÓGICO**

Amostras de sangue periférico de felinos suspeitos clinicamente, sem restrição de raça, idade ou sexo, foram recebidas no LPCV após colheita em tubos com anticoagulante EDTA 10% p/v, no período de abril de 2018 a fevereiro de 2019. Foram processadas no aparelho

automatizado Poch 100-iv Diff (Sysmex, Brasil) e logo em seguida foi realizada extensão sanguínea, sendo corada com kit panótico rápido para análise no microscópio nos aumentos de 400 e 1000 vezes.

### 3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Amostras de sangue total dos animais suspeitos após avaliação hematológica, em que visualizaram-se mórulas intraplaquetárias, foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido (HVU-UFCG). A extração do DNA dessas amostras foi realizada com Brazol<sup>®</sup>, seguindo a recomendação do fabricante, e, então, foram submetidas à técnica nPCR, em que no primeiro ciclo usou 0,5 a 1,0 microgramas do DNA genômico e utilizou-se o primer ECC e ECB para amplificar um fragmento de DNA de 478 pares de base (pb) de rRNA. Os primers utilizados nesta primeira reação podem amplificar DNA de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, *A. bovis* e *A. marginale*. Algumas amostras foram diluídas (identificadas com: - ) para descartar inibição da reação por excesso de DNA.

No segundo ciclo foi empregada um microlitro da primeira reação como matriz e o iniciador EHPL sense e antisense para amplificar o fragmento 384 pb para *Anaplasma platys* (Tabela 1). Como controle negativo (CN) foi utilizado água ultrapura no lugar do DNA e, como controle positivo (CP), uma amostra sabidamente positiva (Tabela 2). Diagnóstico molecular (nPCR) adaptado de Rotondano et al. (2012).

Tabela 1- Sequência dos primers para o gene 16S rRNA utilizados na nested PCR.

Primer	Agente etiológico	Sequência de Primer (5'-3')	Pares de base (pb)
ECC/ECB	<i>Ehrlichia</i> spp.	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	478pb
	<i>Anaplasma</i> spp.	CGTATTACCGCGGCTGCTGGC	(13 a 490)
EHPLsense EHPLantisense	<i>A. platys</i>	TTTTTGTCGTAGCTTGCTATGATA TGTGGGTACCGTCATTATCTTCCCCA	384pb (49 a 432)

Fonte: Rotondano et al. (2012)

Tabela 2- Concentração de componentes do Mix da nested PCR para identificação do gênero e espécie.

Substância	Concentração Inicial	Concentração Final	1x
<b>H<sub>2</sub>O</b>			q.s.p. 50µL
<b>Tampão</b>	10x	1x	5µL
<b>MgCl<sub>2</sub>*</b>	50mM	1,5mM	1,5µL
<b>dNTPs #</b>	10mM	0,2mM	1µL
<b>Primer sense</b>	10µM	0,2µM	1µL
<b>Primer antisense</b>	10µM	0,2µM	1µL
<b>Taq</b>	5U/ µL	2U/reação	0,4µL

\*MgCl<sub>2</sub>- Cloreto de Magnésio; # dNTPs- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados.

Após obtenção da primeira reação contendo 45µL do mix em cada tubo e 5µL do DNA de cada animal, foi realizada a primeira etapa no termociclador, que ocorre em diferentes tempos e temperatura. Foi usada a temperatura de 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 63°C por 30 segundos para a união do DNA com o primer e 72°C para formação de produto pelo tempo de um minuto e por fim quatro minutos a 72°C para extensão final.

Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese, fazendo-se a homogeneização de um microlitro do corante *Blue green*® e cinco microlitros do resultado do produto da PCR, colocadas no gel de agarose a 1,5% contendo também um controle negativo, colocando-se em seguida na eletroforese a uma voltagem de 800V, 400 mA e 70W por 40 minutos até o término, onde se pôde observar em transiluminados UV, quais foram positivas ao gênero produzindo um produto de 478 pares de base.

As amostras positivas ao gênero foram então submetidas à segunda reação, utilizando 1µL de cada. Foram colocadas no termociclador primeiro a 94°C para a quebra do DNA por 10 minutos e para desnaturação por 30 segundos. Então, utilizou-se 55°C por 30 segundos para anelamento do primer com o DNA, 72°C por 30 segundos para formação de produto e por fim 5 minutos para extensão final. Logo então a eletroforese foi realizada e obteve-se o resultado de quais amostras eram positivas para a espécie *Anaplasma platys*.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

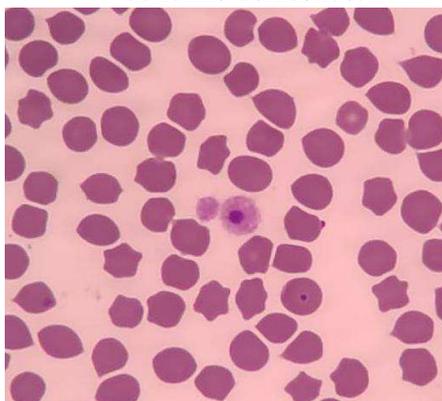
Uma estatística descritiva das alterações hematológicas observadas foi realizada e expressa na forma de percentual de acordo com o diagnóstico molecular. Análise estatística adicionais para diferenciar a acurácia da análise molecular não foi realizada em virtude do número reduzido de animais utilizados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1.244 hemogramas em felinos foram realizados entre abril de 2018 e fevereiro de 2019 no HVU-UFCG. Em 65 amostras foram observadas mórulas em plaquetas (Fig. 1) após avaliação microscópica do sangue em lâmina corada com panótico. Das 65 amostras, 32 foram encaminhadas para o LBM. A observação da mórula em plaquetas não pode ser o diagnóstico para a enfermidade, pois segundo Mylonakis et al. (2003), as inclusões em células sanguíneas pode estar relacionada a processos inflamatórios ou granulações mais densas nas plaquetas, podendo confundir com mórulas na análise em microscópio. Ramos et al. (2009), em estudo com cães, relata que também é possível confundir com mórulas de *Ehrlichia canis*, uma vez que através de avaliação com nPCR confirmou que apenas um de quatro cães com mórula em plaquetas era positivo para *A. platys* e os demais para *E. canis*.

Das 32 amostras analisadas, 18 (56,25%) foram positivas para os gêneros *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. após primeiro ciclo da PCR. Na realização do segundo ciclo da nPCR com as 18 alíquotas positivas na primeira etapa, apenas seis (18,75%) foram positivos para *A. platys*. Correa et al. (2011), através de análise por nPCR, encontraram 13,18% de felinos positivos para o mesmo hemoparasita, em Campos dos Goytacazes-RJ.

Figura 1- Inclusão basofílica em plaqueta de felino doméstico.



Fonte: LPCV-HVU-UFCG

Os valores das alterações hematológicas encontram-se na Tabela 3. Dos 18 gatos positivos ao gênero, apenas quatro apresentavam anemia e nenhum destes foi positivo para a espécie *A. platys*. Dos animais positivos, pôde-se observar que não houve alteração eritrocitária significativa. Apesar de alguns autores relatarem anemia associadas a rickettioses em felinos, Correa et al. (2011) e Lima, Aquino e Paludo (2017) não verificaram alteração de eritrócitos relacionadas a infecção por *A. platys*, sendo um resultado semelhante ao desse estudo.

Tabela 3 – Valores referentes às alterações hematológicas dos animais testados para *A. platys*.

<b>Dados hematológicos</b>	<b>nPCR para <i>A. platys</i></b>	
	<b>Positivos (n=6)</b>	<b>Negativos (n=12)</b>
Anemia normocítica normocrômica	0	2 (16,7%)
Anemia microcítica normocrômica	0	1 (8,3%)
Anemia macrocítica hipocrômica	0	1 (8,3%)
Sem alteração eritrocitária	6 (100%)	8 (66,7%)
Leucocitose	2 (33,3%)	3 (25%)
Sem alteração leucocitária	4 (66,7%)	9 (75%)
Trombocitopenia	2 (33,3%)	4 (33,3%)
Sem alteração plaquetária	4 (66,7%)	8 (66,7%)

Em relação a raça, idade e sexo, todos os seis animais tinham idade acima de um ano, eram sem raça definida, possuindo três (50%) machos e três (50%) fêmeas, mostrando assim que não houve diferença entre esses resultados quanto a infecção pelo agente. De 18 animais positivos para gênero *Anaplasma* sp. ou *Ehrlichia* sp., seis (33,3%) apresentavam trombocitopenia, sendo que essa alteração, na maioria dos casos, está associada a agregação plaquetárias, impossibilitando uma contagem fidedigna tanto do equipamento automático, como na visualização no microscópio. Sendo assim, a trombocitopenia não pode ser associada à infecção pelo agente neste estudo.

Um dos animais positivos para *A. platys*, apresentou neutrófilos tóxicos significando uma reação medular a alguma alteração sistêmica, todavia, o paciente apresentava outra patologia além da anaplasiose, não se podendo inferir qual a alteração leucocitária estava diretamente relacionada à hemoparasitose. Outro felino apresentou anisocitose moderada e policromasia discreta, significando uma resposta medular a uma anemia, apesar dos índices hematológicos apresentarem-se dentro dos valores de referência. Uma hipótese seria que a

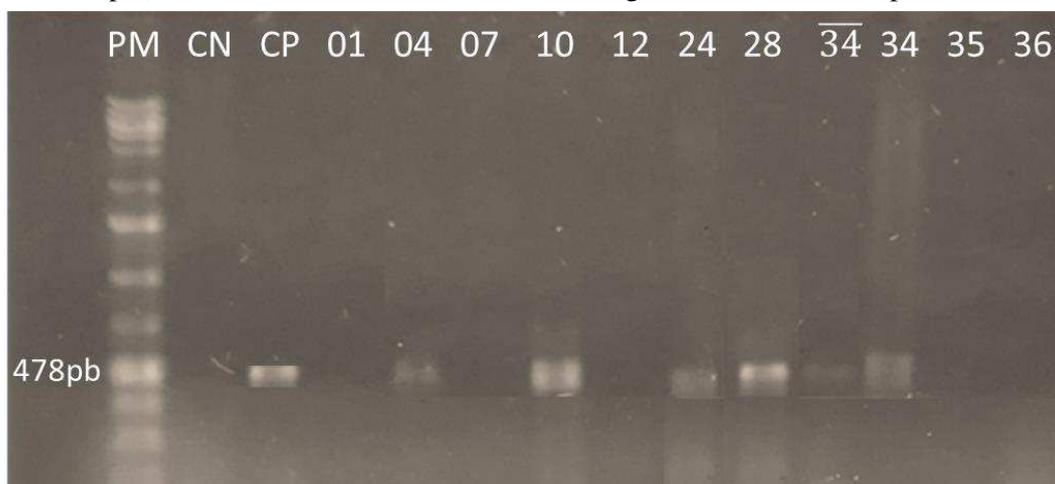
anemia poderia estar mascarada por desidratação. Esse animal também apresentou leucocitose e linfopenia, com linfócitos atípicos, granulares e reativos, e monócitos ativados demonstrando uma resposta inflamatória.

Existem poucos estudos abrangendo a infecção de gatos domésticos por *A. platys* e identificação através da PCR. No Brasil, o primeiro relato foi em Pernambuco, onde acidentalmente, LIMA (2010) encontrou mórulas no sangue de um felino e fez o sequenciamento do DNA que foi semelhante ao de cães estudados em outros países. Foram feitos também, estudos epidemiológicos que constatarem incidências diferentes de animais positivos: Correa et al. (2011) encontrou DNA em 13,18% de 91 gatos no Rio de Janeiro e Lima, Aquino e Paludo (2017) observaram apenas 3,5% de positividade no Distrito Federal.

No presente trabalho, 18,75% (6) foram positivos, valor mais aproximado a Correa et al. (2011). O material biológico utilizado nos ensaios foi sangue total, que segundo Rotondano (2012), é o que apresenta melhor resultado. Os valores desiguais encontrados entre os estudos podem estar relacionados a diferentes fatores, como: método de PCR, primer e material biológico utilizado. Nos três casos, a nPCR foi realizada, porém os primers foram dispares.

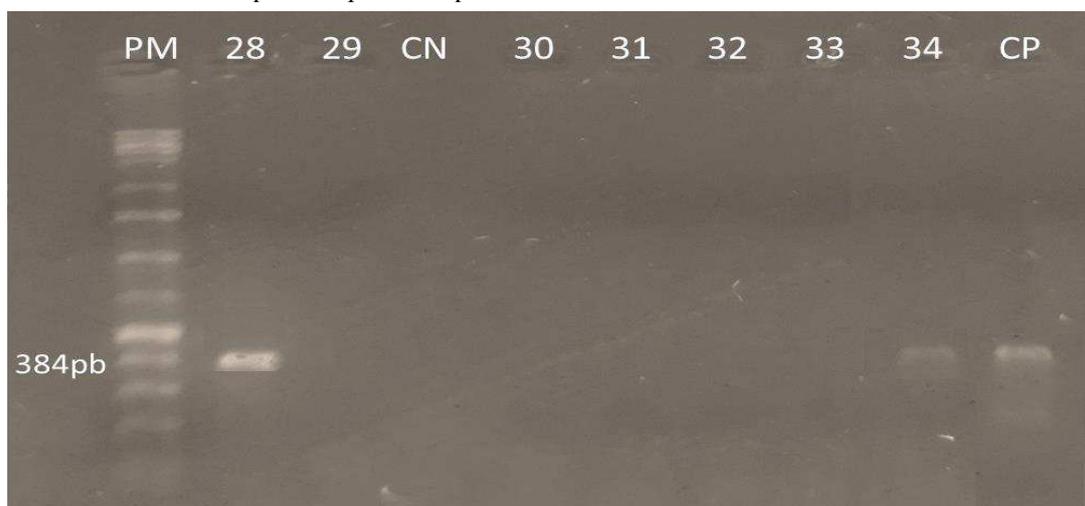
Na primeira reação, as 18 amostras após a ciclagem e eletroforese que se mostraram positivas, amplificaram um fragmento de 478 pares de base (fig. 2). Após a nested PCR, onde se utilizou 1 $\mu$ L do resultado da primeira ciclagem, foi realizada a eletroforese, obtendo-se o resultado positivo de seis felinos, havendo amplificação do fragmento de 384pb (fig. 3). Os primers utilizados nesta segunda reação, amplificam DNA de *A. platys*.

Fig. 2- Amplificação do fragmento de 478 pb do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. (PM – Peso molecular. CN – Controle negativo. CP – Controle positivo).



Fonte: Própria.

Figura 3- Amplificação do fragmento de 384 pb do gene 16S rRNA de *A. platys*, de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp.



Fonte: Própria.

Testes com nPCR negativos em felinos podem estar relacionados a cronicidade da infecção e/ou sequestro esplênico dos organismos infecciosos, de modo que não é possível encontrá-los em sangue periférico e o animal ter a doença de forma subclínica. Littell (2010) afirma que o organismo pode estar em baixa presença na circulação, impossibilitando assim sua detecção, ou por início prévio de tratamento com antibióticos. Outra possibilidade é que o organismo já tenha debelado a infecção, mas mantido títulos de anticorpos detectáveis no sangue (BILLETER et al., 2007; CORREA et al., 2011).

## **5 CONCLUSÃO**

A presença de inclusões plaquetárias em esfregaços sanguíneos de felinos, requer confirmação diagnóstica de anaplasrose através da realização de testes complementares, como a nPCR. Com base no diagnóstico definitivo de gatos domésticos com a hemoparasitose, mais estudos são necessários para entender forma de transmissão e como a doença se desenvolve em felinos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. Erliquioses. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna do Cão e Gato**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. Cap. 83.
- ARRAGA-ALVARAGO, C. M. *et al.* *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An ultrastructural study of experimental and natural infections. **Sage Journal**, v. 40, ed. 2, p. 149-156, 2003.
- ARRAGA-ALVARAGO, C. M. *et al.* Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, ed. 6, p. 1161-1165, 2014.
- BEAUFILS, J. P. *et al.* *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France : description of the case, and characterization of the agent. **Revue Méd. Vét.**, v. 153, n. 2, p. 85-90, 2002.
- BILLETER, S. A. *et al.* Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 194-198, 2007.
- BREITSHWERDT, E. B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e gato**. Tradução Adriana Coutinho, et al. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. v. 2, cap. 86, p. 422-429.
- CORREA, E. S. *et al.* Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 899-909, 2011.
- CHANG, W. L.; PAN, M. J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3142-3146, 1996.
- DAGNONE, A. S. **Caracterização molecular de espécies da família anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS**. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.
- DINIZ, M. G.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Métodos moleculares de interesse na pesquisa em odontologia. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica: ciência, ensino e pesquisa**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2018. Cap. 26, p. 391-405, 2018.
- DOWSON, J. E. *et al.* Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis, **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2741-2745, 1991.
- DUMLER, J. S. *et al.* 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* [...]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.
- EVERTON, E. B. **Diagnóstico e epidemiologia molecular da anaplasnose e theileriose equina no estado do Pará**. Dissertação(Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.
- FERRÃO, C. M. *et al.* Ehrlichiose granulocítica. **A Hora Veterinária**, v. 26, n.152, p. 61-63, 2006.

- FERREIRA, R. F. *et al.* 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**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 5-8, 2008.
- HAVEY, J. W.; SIMPSON C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic Thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, ed. 2, p. 182-188, fevereiro de 1978.
- INOKUMA, H. *et al.* Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 63, p. 815-817, 2001.
- INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUE, P. Detecção do DNA de *Ehrlichia platys* em carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) na Ilha de Okinawa, Japão. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, nov. 2000.
- KAWAHARA, M. *et al.* Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 89-96, jan. 1993.
- KORDICK, S. K. *et al.* Coinfecção com múltiplos patógenos transmitidos por carrapatos em um canil Walker Hound na Carolina do Norte. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, ago. 1999.
- LESTER, S. J. *et al.* Infecção por *Anaplasma phagocytophilum* (anaplasmose granulocítica) em um cão da ilha de Vancouver. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 9, pag. 825-827, 2005.
- LIMA, M. L. F., *et al.* Detecção molecular de *Anaplasma platys* em um gato naturalmente infectado no Brasil. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 41, 2010.
- LIMA, M. A.; AQUINO, L. C.; PALUDO, G. R. Evaluation of Anaplasmataceae Family Agents Infection in Domestic Cats, **Pakistan Veterinary Journal**, v. 37, n. 2, p. 201-204, 2017.
- LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1121-1140, Oklahoma, 2010.
- MACHADO, G. P.; DAGNONE, A. S.; SILVA, B. F. Anaplasmose trombocítica canina - uma breve revisão. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Ano VIII, n.15, jul. 2010.
- MASSUNG, R. F., *et al.* Nested PCR assay for detection of granulocytic Ehrlichiae. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1090-1095, jan. 1998.
- MATEI, I. A. *et al.* Detecção molecular da infecção por *Anaplasma platys* em cães e carrapatos do Quênia e Costa do Marfim. **Parasitas e Vetores**, v. 9, n.1, mar. 2016.
- MORILLO, J. N. *et al.* Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 5, p. 518-524, 2003.
- MORITA, E. *et al.*, 2003. Different frequencies of Streptococcus anginosus infection in oral cancer and esophageal cancer. **Cancer Science**, v. 94, n. 6, p. 492-496, 2003.
- MYLONAKIS, M. E., *et al.* Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods, **Veterinary Microbiology**, v. 91, p. 197-204, 02 fev. 2003.

NICHOLSON, W. L. *et al.* Serologic evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in wild rodents (Muridae: *Sigmodontinae*) in the United States. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 695–700, mar. 1998.

RAMOS, C. *et al.* Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, Jaboticabal-SP, dez. 2009.

RIKIHISA, Y. Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses, and humans. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 250-251, 2000.

RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. **New York Academy of Sciences**, Ohio, v. 990, p. 548–555, 2003.

ROTONDANO, T. E. F. *et al.* An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

SANCHES, C. D. C. **Estudo histopatológico das lesões viscerais da Erliquiose Monocítica Canina na fase crônica**. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

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

SOARES, A. O. *et al.* Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de juiz de fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 13-16, jan. 2006.

SUKSAWAT, T. *et al.* Coinfecção com três espécies de *Ehrlichia* em cães da Tailândia e da Venezuela com ênfase na consideração da estrutura secundária do DNA ribossômico 16S. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 90-93, jan. 2001.

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 del Salud Publica**, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

VALONES, M. A. A. *et al.*, 2009. Princípios e aplicações da reação em cadeia da polimerase em campos de diagnóstico médico: uma revisão. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2009.