



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

Ocorrência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Distrito Federal e Goiás.

WANESSA A. CARLOS DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

DEZEMBRO/2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**Ocorrência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em
canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Distrito
Federal e Goiás.**

WANESSA APARECIDA CARLOS DA SILVA

ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 118

BRASÍLIA/DF

DEZEMBRO/2015


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Ocorrência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys*
em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no
Distrito Federal e Goiás.**


WANESSA APARECIDA CARLOS DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

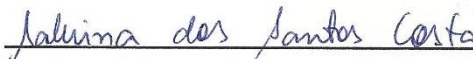
APROVADA POR:



GIANE REGINA PALUDO, DOUTORA (UnB)



SIMONE PERECMANIS, DOUTORA (UnB)



SABRINA DOS SANTOS COSTA, DOUTORA (UPIS)

BRASÍLIA/DF, 9 DE DEZEMBRO DE 2015.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Silva, W. A. C. **Ocorrência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Distrito Federal e Goiás.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 30 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Da Silva, Wanessa Aparecida Carlos

Ocorrência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Distrito Federal e Goiás. / Wanessa Aparecida.

Orientação de Giane Regina Paludo – Brasília, 2015. 30 p. : il. Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Hemoparasitoses. 2. Carnívoros selvagens. 3. Riquetsioses. I. Da Silva, W. A. C. II. Título

CDD ou CDU

Agris / FAO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e à Nossa Senhora, que sempre guiaram meu caminho me trazendo até aqui, dando discernimento e perseverança durante o caminho.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora, dra. Giane Paludo, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e amizade de sempre.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou em todas as decisões, me dando conforto e força, sempre me estimulando e encorajando para continuar me aprimorando pessoal e profissionalmente, amo vocês.

Agradeço aos meus amigos do grupo N.A.T.A.L. que sempre estiveram do meu lado dando um suporte espiritual imenso e indispensável.

Agradeço aos residentes, técnicas, pibics e estagiários dos Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Hvetinho-Unb, por toda amizade, apoio e ajuda durante o mestrado.

À Batata, Nat e Filipe por todo apoio, por sempre estarem dispostos a me escutar, pelo ombro amigo, palavras de conforto e por me aguentarem, vocês foram imprescindíveis.

Obrigada ao meu namorado, que sempre caminhou ao meu lado, com sinceridade, carinho, amizade e muito amor, me ajudando sempre, te amo.

Dedico este trabalho aos meus animais, Cheddar, Tequila, Docinho e meus peixinhos, pelo amor incondicional e por serem sempre uma fonte inesgotável de admiração e inspiração.

RESUMO

Da Silva, W. A. C. **Ocorrência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Distrito Federal e Goiás.** [Occurrence of *Ehrlichia* spp and *Anaplasma platys* infection in wild captive canidae and felidae from Distrito Federal and Goiás, Brasil]. 2015. 30 p. Dissertação de Mestrado (Conclusão do curso de Pós-Graduação em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Bactérias do gênero *Ehrlichia* e do gênero *Anaplasma*, pertencentes à família Anaplasmataceae, são parasitos intra-celulares obrigatórios, de leucócitos e plaquetas respectivamente, transmitidos por carrapatos que causam infecção em diversos hospedeiros vertebrados, podendo causar doença branda a severa em animais domésticos, silvestres e no homem. A erliquiose e anaplasmosose são endêmicas no Brasil, podendo ser causadas pelos agentes *E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophylum* e *A. platys* ou por co-infecção por estes ou outros patógenos transmitidos por carrapatos. Sabe-se que esses agentes são capazes de infectar carnívoros silvestres, mas pouco se sabe sobre as espécies responsáveis ou qual o papel dos animais silvestres na disseminação da doença. O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys* em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro por meio da técnica molecular da PCR e analisar se há a presença de alterações laboratoriais consistentes com a infecção comparativamente com animais domésticos. Dentre os felídeos, foi verificada uma frequência de 36,4% (12/33) para *Anaplasmataceae*, de 16,7% (2/12) para *E. canis* e de 16,7% (2/12) para *A. platys*. Dos canídeos 72,2% (13/18) foram positivos na PCR para *Anaplasmataceae* e destes, 30,76% (4/13) foram positivos para *E. canis* e 53,85% (7/13) para *A. platys*. Dois canídeos apresentaram co-infecção por *E. canis* e *A. platys*. Os animais positivos apresentaram alterações hematológicas condizentes com a infecção pelos agentes estudados, todavia não foi verificada diferenças significativas entre os valores hematológicos e o *status* infeccioso dos animais estudados.

ABSTRACT

Bacteria of the *Ehrlichia* and *Anaplasma* genus, which belong to *Anaplasma* family, are mandatory intracellular parasites of leucocytes and platelets, respectively, and are transmitted by ticks that cause infection in several vertebrate hosts, which may inflict from mild to severe sickness in wild and domestic animals and in humans. *Ehrlichiosis* and *anaplasmosis* are endemic in Brazil and can be caused by *E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophylum* and *A. platys* agents, or by a coinfection with these or other pathogens transmitted by ticks. It is known that these agents are capable of infecting wild carnivores, even though, little is known about the responsible species or what roll do wild animals play in disseminating the disease. The present study aimed to determine the occurrence of *Ehrlichia spp* and *Anaplasma platys* in wild canids and felids kept in captivity by using the molecular technique of PCR, to analyze whether there is a presence of laboratory findings consistent with the infection, in comparison with domestic animals. Among the felids was verified a frequency of 36,4% (12/33) for *Anaplasma*, of 16,7% (2/12) for *E. canis* and of 16,7% (2/12) for *A. platys*. In canids, 72,2% (13/18) were positive in PCR for *Anaplasma* and among them, 30,76% (4/13) were positive for *E. canis* and 53,85% (7/13) for *A. platys*. Two canids presented coinfection by *E. canis* and *A. platys*. Weren't verified significant differences between hematological values and the infectious status of the studied animals, possibly showing to be at the subclinical phase of the disease or to have an improved resistance to infection by these agents.

Lista de Figuras

Figura 1. Pcr <i>E. canis</i>.....	19
---	-----------

Índice

Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas.....	9
Lista de símbolos e abreviações.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
Material e métodos.....	13
Análise Hematológica.....	13
Extração do DNA.....	13
Reação em Cadeia da Polimerase.....	14
RESULTADOS.....	16
FELIDEOS.....	16
CANÍDEOS.....	19
Discussão.....	22
Conclusão.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos, sequências e genes utilizados, tamanho do amplicon.	14
Tabela 2. Relação das espécies dos felídeos selvagens estudados, mostrando a frequência e percentual de cada espécie.	16
Tabela 3. Relação dos felídeos selvagens positivos para família Anaplasmataceae. Nome, origem, sexo, espécie, e se foram ou não positivos para as PCR para <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	16
Tabela 4. Frequência dos felídeos positivos e negativos nas PCR para Anaplasmataceae, <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	17
Tabela 5. Mediana e variação dos parâmetros hematológicos encontrados para os felídeos selvagens positivos e negativos para a PCR Anaplasmataceae. Letras iguais em uma mesma linha denotam que não houve diferenças significativas entre cada variável ($P \leq 0,05$).	18
Tabela 6. Relação das espécies dos canídeos selvagens estudados, mostrando a frequência e percentual de cada uma.	20
Tabela 7. Canídeos positivos para PCR de Anaplasmataceae, mostrando também nome, local de origem, sexo, espécie e seus resultados nas PCR para <i>E. canis</i> e <i>Anaplasma platys</i>	20
Tabela 8. Frequência dos canídeos positivos e negativos nas PCR para Anaplasmataceae, <i>E. canis</i> e <i>A. platys</i>	21
Tabela 9. Mediana e variação dos parâmetros hematológicos dos canídeos selvagens positivos e negativos para a PCR Anaplasmataceae. Letras iguais numa mesma linha denotam que não houve diferenças significativas entre cada variável ($P \leq 0,05$).	22

Lista de símbolos e abreviações

°C	Graus Celcius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dl	Decilitros
dNTP	Trifosfatos de desoxirribonucleosídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
<i>A. platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
<i>E. chafeensis</i>	<i>Ehrlichia chafeensis</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3fosfato desidrogenase
g/dl	Gramas por Decilitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mg/dl	Miligramas por Decilitro
mg/Kg	Miligramas por Quilo
mM	Mili Molar
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
pmol	Picomoles
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
UnB	Universidade de Brasília
U	Unidade
µl	Microlitros
FJZB	Fundação Jardim Zoológico de Brasília
LMPM	Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Ehrlichia* e do gênero *Anaplasma*, pertencentes à família *Anaplasmales*, são parasitos intra-celulares obrigatórios, de leucócitos e plaquetas respectivamente, transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que causam infecção em diversos hospedeiros vertebrados, podendo causar doença de branda a severa em animais domésticos, silvestres e no homem (ALMOSNY, 2002). A erliquiose e anaplasmoze são endêmicas no Brasil, podendo ser causadas pelos agentes *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophylum* e *A. platys* ou por co-infecção com estes ou outros patógenos transmitidos por carrapatos (JORGE et al., 2010; CORREA et al., 2011;). *E. canis* foi o primeiro agente da erliquiose descrito em cães e é o agente erliquial mais importante de cães no mundo (ALMOSNY, 2002; ANDRÉ, 2008; LITTLE, 2010; MANOEL, 2010).

Sabe-se que agentes *Anaplasmales* são capazes de infectar carnívoros silvestres, mas pouco se sabe sobre as espécies responsáveis ou qual o papel dos animais silvestres na disseminação da doença (ANDRÉ, 2008). A detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia chaffeensis* em cães no Estado de Minas Gerais, associada à detecção molecular pela primeira vez do agente da erliquiose monocítica humana em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) ressaltam a necessidade de mais estudos a respeito dos vetores, reservatórios e agentes envolvidos nesta enfermidade, a fim de aumentar a efetividade do diagnóstico, fator importante não apenas pelo caráter zoonótico do agente, mas também para a própria preservação das espécies silvestres (ANDRÉ, 2008; RIECK, 2011).

Os principais sinais apresentados pelos animais infectados por agentes erliquiais são febre, letargia, anorexia, mialgia, esplenomegalia, linfadenopatia e diátese hemorrágica, com anemia, leucocitose ou leucopenia e trombocitopenia cíclica sendo que a doença aguda se manifesta dentro de 2 a 4 semanas após a transmissão pelo vetor (MACIEIRA et al., 2005). Após o período de incubação, o animal entra numa fase subclínica com ausência de sinais clínicos e uma persistente trombocitopenia, fase que pode durar de meses a anos. Na fase crônica os animais infectados apresentam comumente anemia normocítica normocrômica arregenerativa,

pela destruição dos precursores hematopoiéticos na medula óssea pelo agente, e uma trombocitopenia severa, apresentando prostração e distúrbios hemorrágicos, podendo levar a óbito (DANTAS-TORRES, 2008; LITTLE, 2010).

A infecção por agentes erliquiais é identificada através da visualização da mórula da bactéria no interior dos leucócitos ou plaquetas através da análise do esfregaço sanguíneo ou da capa leucocitária por microscopia óptica, podendo também ser diagnosticada através de métodos sorológicos e moleculares (PCR) (ANDRÉ, 2008; MANOEL, 2010).

A distinção entre espécies de *Ehrlichia* era baseada na região, espécie afetada e carrapato endêmico na área. Estudos moleculares realizados nos últimos anos demonstraram que outras espécies do parasito podem ser transmitidas por outros carrapatos que são endêmicos em diferentes regiões (ALMOSNY, 2002).

O presente estudo teve como objetivo analisar a presença e frequência da infecção por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma platys*, importantes agentes *Anaplasmataceae* infectantes de cães domésticos, em felídeos e canídeos selvagens mantidos em cativeiro, informações não apenas de interesse acadêmico, mas também de importância para diagnóstico, tratamento e prevenção dessas doenças.

Materiais e métodos

Foram colhidos aproximadamente 3,0 ml de sangue da veia jugular, cefálica ou femoral de 33 felídeos oriundos da Fundação Jardim Zoológico de Brasília e do NEX (No Extinction) e 20 canídeos selvagens oriundos da Fundação Jardim Zoológico de Brasília, independente de sexo e idade.

Alíquotas do sangue colhido foram acondicionadas em tubo com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante, identificados e armazenados em caixa térmica refrigerada até chegarem ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e processadas no mesmo dia.

Análise Hematológica

O sangue contendo anticoagulante foi utilizado para realização do hemograma. Para a determinação do número de hemácias, leucócitos, plaquetas e concentração de hemoglobina, foi utilizado contador semi-automático de células, modelo Micros ABC Vet (Horiba ABX). O Volume Globular (VG) foi determinado usando a técnica de microhematócrito. Os esfregaços preparados foram corados com Panótico (NewProv) para contagem diferencial de leucócitos, análise morfológica das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas. O restante das amostras com EDTA foi armazenado à 4°C até a extração do DNA.

Extração do DNA

As amostras acondicionadas a 4^o graus após as análises hematológicas foram utilizadas para a extração do DNA realizada no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (LMPM) do Hospital Veterinário da UnB. Foi utilizado o kit de extração comercial Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit 9GE Healthcare® e seguido o processamento de acordo com as recomendações do fabricante. Após este processo, o produto obtido foi armazenado congelado a -20°C até a realização do PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR para a identificação dos animais infectados e das espécies infectantes foi realizada a partir da síntese de oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA do parasito, os oligonucleotídeos utilizados foram o EHR16SD e EHR16SR, que se anelam nos genes da *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *A. equi*, *A. phagocytophila*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *Wolbachiapipientis*, *E. sennetsu*, *R. risticii* e *N.helminthoeca* (INOKUMA et al., 2001). Os oligonucleotídeos Platys e EHR16SR foram utilizados para amplificação do gene *Anaplasma platys* e os oligonucleotídeos ECAN5 e HE3 para *Ehrlichia canis* (MURPHY et al., 1998). Todos os oligonucleotídeos utilizados nas reações estão descritos na tabela 1. Como controle negativo para o PCR, para verificar se houve contaminação de algum dos reagentes, foi utilizado água e como controle positivo foi utilizado o sangue de um animal naturalmente infectado confirmado pela visualização de mórulas no esfregaço sanguíneo. Foi realizada PCR do GAPDH (BIRKENHEUER, 2003) para controle da qualidade da extração e para verificar se existiam inibidores de PCR.

Tabela 1. Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizados, genes amplificados e tamanhos dos produtos da PCR.

Oligonucleotídeos	Sequência	Gene	Pares Base	ReferênciaBibliográfica
GAPDH-R	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	GAPDH	400 pb	Birkenheyer et al., 2003
GAPDH-F	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	GAPDH		Birkenheyer et al., 2003
EHR16sd	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	16S rRNA	345 pb	Inokuma, 2001
EHR16sr	TAGCACTCATCGTTTACAGC	16S rRNA		Inokuma, 2001
Platys	GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG	16S rRNA	678 pb	Inokuma, 2001
ECAN5	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	16S rRNA		Murphy, 1998
HE3	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	16S rRNA	398pb	Murphy, 1998

As reações para detecção da família *Anaplamataceae* utilizaram 10 ng de DNA, 1X tampão de PCR (Invitrogen®), 0,25mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen®),

1,6mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 1µM de cada oligonucleotídeo, 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 25µl. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 34 ciclos repetidos de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamentos (53°C por 30 segundos), extensão (72°C por 90 segundos) e extensão final de 72°C por 5 minutos. Nas reações para detecção da *Anaplasma platys* um oligonucleotídeo 5'-3' específico foi utilizado (Platys) combinado com o oligonucleotídeo 3'-5' EHR16SR. Cinco microlitros de cada amostra de DNA foram utilizados para um volume final de 25µl e as concentrações foram as mesmas da PCR para *Anaplasmataceae*. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos repetidos de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamentos (51°C por 30 segundos), extensão (72°C por 90 segundos) e extensão final (72°C por 5 minutos). As reações para detecção de *Ehrlichia canis* continham 1µl de DNA, 1X de tampão de PCR (Invitrogen®), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen®), 2mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,25mM de cada oligonucleotídeo, e 0,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 25µl. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos repetidos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (63°C por 2 minutos), extensão (72°C por 90 segundos) e extensão final 72°C por 5 minutos. Todas as reações foram realizadas utilizando o mesmo termociclador C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad).

Os resultados das PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e observado em transiluminador de fluorescência. Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (LMPM) do Hospital Veterinário da UnB, Distrito Federal.

A estatística descritiva e comparações foram baseadas na mediana e desvio padrão. O teste Shapiro-wilk foi utilizado para determinar a normalidade da distribuição das variáveis contínuas. O teste Mann-Whitney U foi usado para determinar se houve diferença significativa entre os grupos de animais (positivos e negativos para cada PCR de cada agente) para variáveis hematológicas contínuas distribuídas de forma não normal. O programa utilizado foi o SPSS versão 3.3.2, tendo sido considerados significativos os resultados com significância $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

FELIDEOS

Foram avaliadas 33 amostras de felídeos selvagens mantidos em cativeiro provenientes da Fundação Zoológico de Brasília e do NEX (No Extinction) localizado em Cocalzinho - Goiás, de diversas espécies, independente de sexo ou idade. A tabela 2 relaciona as espécies de felídeos selvagens estudados, com a frequência e percentual de cada espécie amostrada no presente estudo. Destes, 36,4% (12/33) foram positivos para *Anaplasmataceae* sendo 5 onças pintadas (**OP1**, **OP2**, **OP3**, **OP4** e **OP5**), 2 jaguatiricas (**J1** e **J2**), 1 suçuarana (**S**), 2 gatos palheiros (**GP1** e **GP2**), 1 gato do mato pequeno (**GMP**) e 1 gato maracajá (**GM**). Para *E. canis* 16,7% (2/12) felídeos foram positivos sendo a suçuarana (**S**) e o gato maracajá (**GM**) e 16,7% (2/12) foram positivos para *A. platys* sendo 1 jaguatirica (**J1**) e 1 onça pintada (**OP1**). Não houve presença de co-infecção por *E. canis* e *A. platys* dentre os felídeos estudados. Oito felídeos positivos para *Anaplasmataceae*, foram negativos tanto para *E. canis* quanto para *A. platys* (**OP1**, **OP2**, **J2**, **GP1**, **GMP**, **OP4**, **GP2**, **OP5**).

Tabela 2. Relação das espécies dos felídeos selvagens estudados, mostrando a frequência e percentual de cada espécie.

Espécie	Frequência	Percentual (%)
Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	11	33,3
Jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>)	2	6,1
Gato-palheiro (<i>Oncifelis colocolo</i>)	3	9,1
Suçuarana (<i>Puma concolor</i>)	6	18,2
Gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>)	1	3,0
Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	1	3,0
Tigre-de-bengala (<i>Panthera tigris</i>)	4	12,1
Jaguarundi (<i>Puma yagouaroundi</i>)	3	9,1
Leão-africano (<i>Panthera leo</i>)	2	6,1
Total	33	100,0

esenta a relação dos felídeos selvagens positivos para família *Anaplasmataceae*, com nome, procedência, sexo, espécie, e se foram ou não positivos para as PCR de *E. canis* e *Anaplasma platys*. A tabela 4 mostra a frequência dos felinos selvagens

A

tab

ela

3

apr

positivos para PCR de cada agente infeccioso. Todas as amostras de DNA testadas foram positivas para a presença do gene GAPDH, indicando que o DNA estava íntegro e que não havia inibidores da reação. Em nenhum dos esfregaços avaliados foram encontradas mórulas sugestivas de infecção por *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma platys*.

Tabela 3. Relação dos felídeos selvagens positivos para família *Anaplasmataceae*. Nome, origem, sexo, espécie, e se foram ou não positivos para as PCR para *E. canis* e *A. platys*.

Tabela 4. Frequência dos felídeos positivos e negativos nas PCR para *Anaplasmataceae*, *E. canis* e *A. platys*.

Nome	Origem	Sexo	Espécie	<i>E. canis</i>	<i>Anaplasma platys</i>
OP1	NEX	Macho	Onça Pintada (<i>P.onca</i>)	-	+
OP2	ZOO	Fêmea	Onça Pintada (<i>P.onca</i>)	-	-
OP3	ZOO	Fêmea	Onça Pintada (<i>P.onca</i>)	-	-
OP4	NEX	Macho	Onça Pintada (<i>P. onca</i>)	-	-
OP5	NEX	Macho	Onça Pintada (<i>P.onca</i>)	-	-
J1	ZOO	Macho	Jaguaririca (<i>L.pardalis</i>)	-	+
J2	NEX	Macho	Jaguaririca (<i>L. pardalis</i>)	-	-
GP1	ZOO	Macho	Gato Palheiro (<i>O. colocolo</i>)	-	-
GP2	ZOO	Macho	Gato Palheiro (<i>O. colocolo</i>)	-	-
S	NEX	Macho	Suçuarana (<i>P. concolor</i>)	+	-
GM	ZOO	Macho	Gato Maracajá (<i>L.wiedii</i>)	+	-
GMP	ZOO	Macho	Gato do Mato Pequeno (<i>L. tigrinus</i>)	-	-

	PCR <i>Anaplasmataceae</i>	PCR <i>E.canis</i>	PCR <i>A.platys</i>
negativo	21/63,6%	10/83,3%	10/83,3%
positivo	12/36,4%	2/16,7%	2/16,7%
Total	33/100%	12/100%	12/100%

A tabela 5 apresenta a mediana e a variação dos resultados dos hemogramas e leucogramas dos felídeos selvagens positivos e negativos para *Anaplasmataceae*.

Todas as variáveis hematológicas (Número de hemácias, VG, plaquetas, leucócitos totais, segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos) seguiram distribuição não-normal. Não houveram diferenças significativas das variáveis hematológicas entre os grupos de felídeos positivos e negativos ($P \leq 0,05$). Em oito animais não foi possível a realização das análises laboratoriais devido a colheita ter sido realizada em local e período em que o material não chegou em tempo viável para a realização das análises hematológicas, sendo apenas utilizado para as análises moleculares, para haver um mínimo de aproveitamento do material.

Tabela 5. Mediana e variação dos parâmetros hematológicos encontrados para os felídeos selvagens positivos e negativos para a PCR Anaplasmataceae. Letras iguais em uma mesma linha denotam que não houve diferenças significativas entre cada variável ($P \leq 0,05$).

Parâmetros	Positivos	Negativos
N. de hemácias ($\times 10^6/\text{mL}$)	6,82 (7 – 9) _a	4,98 (3 – 11) _a
VG (%)	32,00 (27 – 39) _a	35,00 (21 – 50) _a
Plaquetas	376.000 (180 – 539) _a	279.000 (110 – 408) _a
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	11.000 (7.900 – 12.400) _a	9.300 (5.800 – 17.000) _a
Segmentados ($\times 10^3/\text{mL}$)	7.590 (4.898 – 10.788) _a	7.298 (3.132 – 10.200) _a
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	2.552 (1.089 – 2.970) _a	2.494 (420 – 5.610) _a
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mL}$)	176 (0 – 1.736) _a	214 (0 – 1.360) _a
Monócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	237 (110 – 372) _a	168 (0 – 497) _a

Não foram encontradas relações significativas entre o resultado da família *Anaplasmataceae* e espécie ($p=0,064$), local de origem ($p=0,346$) e idade ($p=0,909$). Todavia foi verificada significância estatística entre este resultado e a variável sexo dos animais, sendo que felídeos selvagens machos mostraram uma maior tendência a terem infecção por *Anaplasmataceae* ($p=0,041$) que fêmeas, todavia essa tendência se deve pelo maior número de machos do que fêmeas amostradas. Não foi possível estabelecer essa relação entre os grupos e a infecção por *E. canis* e *A. Platys* devido ao pequeno número de animais positivos para cada agente.

Apenas uma Jaguatirica apresentou sinais clínicos com secreção nasal e ocular, sendo positiva para infecção por *A. platys*.

A figura 1 mostra o resultado de PCR para *E. canis* em gel de agarose, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de fluorescência, onde pode ser observado o produto de 398pb.

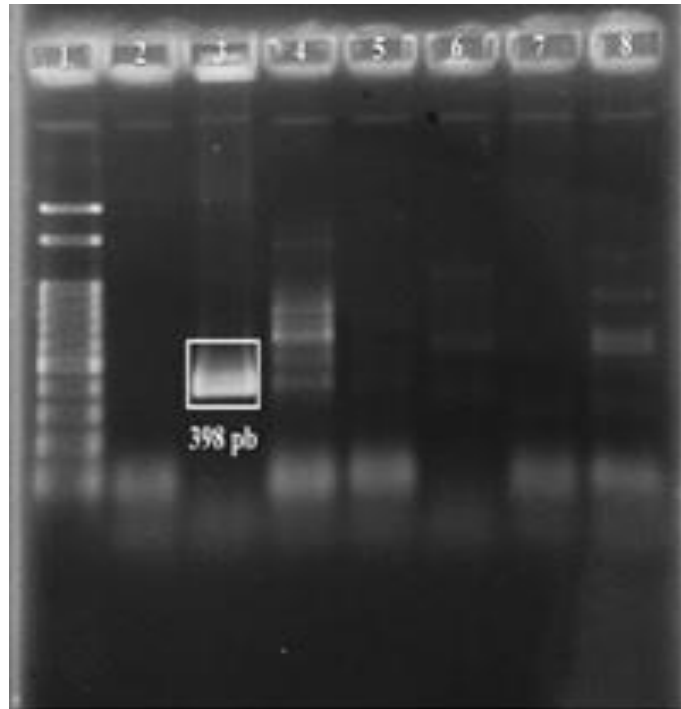


Figura 1. Resultado da PCR para *Ehrlichia canis* utilizando-se os oligonucleotídeos ECAN5 e HE3. 1 - Marcador de peso molecular; 2- controle negativo; 3- controle positivo com produto de 398pb; 4 - animal positivo (GM); 5, 6, 7 e 8 -animais negativos.

CANÍDEOS

Foram analisadas 18 amostras de canídeos selvagens mantidos em cativeiro, provenientes da Fundação Jardim Zoológico de Brasília, independente de espécie, sexo ou idade. A tabela 6 apresenta a relação das espécies de canídeos selvagens

estudados com a frequência e percentual amostrado de cada uma. Dentre estes, 72,2% (13/18) foram positivas na PCR para *Anaplasmataceae* sendo 6 lobos-guará (**LG1, LG2, LG3, LG4, LG5 e LG6**), 4 raposas do campo (**RC1, RC2, RC3 e RC4**), 5 cachorros do mato (**CM1, CM2 e CM3**). Destes, 30,76% (4/13) foram positivos para *E. canis* sendo 2 raposas do campo (**RC1 e RC2**), e 2 lobos-guará (**LG4 e LG5**). Para a PCR de *A. platys* 53,85% (7/13) foram positivos, sendo 4 Lobos-guará (**LG1, LG2, LG3 e LG4**), 2 raposas do campo (**RC2 e RC3**), e 1 cachorro do mato (**CM4**). Dois canídeos apresentaram co-infecção por *E. canis* e *A. platys* (**RC2 e LG4**). Quatro canídeos positivos para *Anaplasmataceae* foram negativos para *E. canis* e *A. platys* (**CM1, CM2, RC4 e LG6**). Todas as amostras de DNA testadas foram positivas para a presença do gene GAPDH, indicando que o DNA estava íntegro e que não havia inibidores da reação. Em nenhum dos animais estudados foram encontradas mórulas de *Ehrlichia* spp e/ou *Anaplasma platys* nos esfregaços confeccionados a partir das amostras de sangue colhidas.

Tabela 6. Relação das espécies dos canídeos selvagens estudados, mostrando a frequência e percentual de cada uma.

Espécie	Frequência	Percentual (%)
lobo-guará (<i>Chrysocyonbrachyurus</i>)	6	33,3
raposa-do-campo (<i>Lycalopexvetulus</i>)	5	27,8
cachorro-do-mato (<i>Cerdocyonthous</i>)	5	27,8
cachorro-do-mato-vinagre (<i>Speothosvinaticus</i>)	2	11,1
Total	18	100,0

A tabela 7 apresenta nome, origem, sexo e espécie dos canídeos positivos para *Anaplasmataceae*, e se foram positivos para *E. canis* e/ou *A. platys* nas análises moleculares. A tabela 8 apresenta as frequências dos canídeos positivos e negativos para PCR de cada agente pesquisado.

Tabela 7. Canídeos positivos para PCR de *Anaplasmataceae*, mostrando também nome, local de origem, sexo, espécie e seus resultados nas PCR para *E. canis* e *Anaplasma platys*.

<u>Nome</u>	<u>Origem</u>	<u>Sexo</u>	<u>Espécie</u>	<u>E. canis</u>	<u>Anaplasma</u>
LG1	ZOO	Fêmea	Lobo Guará(<i>C.brachyurus</i>)	-	+

LG2	ZOO	Fêmea	Lobo Guará(<i>C.brachyurus</i>)	-	+
LG3	ZOO	Macho	Lobo Guará(<i>C.brachyurus</i>)	-	+
LG4	ZOO	Fêmea	Lobo Guará(<i>C.brachyurus</i>)	+	+
LG5	ZOO	Macho	Lobo Guará(<i>C.brachyurus</i>)	+	-
LG6	ZOO	Macho	Lobo Guará(<i>C.brachyurus</i>)	-	-
RC1	ZOO	Macho	Raposa do Campo(<i>L.vetulus</i>)	+	-
RC2	ZOO	Macho	Raposa do Campo(<i>L.vetulus</i>)	+	+
RC3	ZOO	Fêmea	Raposa do Campo(<i>L.vetulus</i>)	-	+
RC4	ZOO	Fêmea	Raposa do Campo(<i>L.vetulus</i>)	-	-
CM1	ZOO	Macho	Cachorro do Mato (<i>C.thous</i>)	-	-
CM2	ZOO	Macho	Cachorro do Mato(<i>C.thous</i>)	-	-
CM3	ZOO	Macho	Cachorro do Mato(<i>C.thous</i>)	-	+

Tabela 8. Frequência dos canídeos positivos e negativos nas PCR para *Anaplasmataceae*, *E. canis* e *A. platys*.

	PCR <i>Anaplasmataceae</i>	PCR <i>E.canis</i>	PCR <i>A. platys</i>
negativo	5/27,8%	9/69,24%	6/46,15%
positivo	13/72,2%	4/30,76%	7/53,85%
Total	18/100%	13/100%	13/100%

A tabela 9 apresenta a mediana e a variação dos resultados dos hemogramas dos canídeos selvagens positivos e negativos para *Anaplasmataceae*. De dois animais não foi possível realizar a análise hematológica devido as amostras serem coletadas em dias em que não foi possível o imediato processamento das mesmas, inviabilizando as análises hematológicas.

Todas as variáveis hematológicas (Número de hemácias, VG, plaquetas, leucócitos totais, segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos) seguiam distribuição não-normal. Não houve diferença significativas nas variáveis hematológicas entre os grupos positivos e negativos para as PCR *Anaplasmataceae* e *E. canis* ($P \leq 0,05$). Para a PCR de *A. platys*, o único parâmetro hematológico que apresentou diferença significativa estatisticamente entre os grupos (positivos e negativos) foi a média dos linfócitos ($p = 0,05$), que foi mais elevada nos animais positivos.

Os canídeos não apresentaram estatisticamente maior infecção por *Anaplasmataceae*, *E. canis* ou *A. platys*, quando comparadas as variáveis espécie, sexo, origem ou idade ($P \leq 0,05$).

Tabela 9. Mediana e variação dos parâmetros hematológicos dos canídeos selvagens positivos e negativos para a PCR Anaplasmataceae. Letras iguais numa mesma linha denotam que não houve diferenças significativas entre cada variável ($P \leq 0,05$).

Parâmetros	Positivos	Negativos
N. de hemácias ($\times 10^6/\text{mL}$)	3,88 (3,20 – 8,78) _a	4,18 (1,80 – 6,32) _a
VG (%)	34,00 (25 – 49) _a	39,00 (15 – 21) _a
Plaquetas	232.000 (110 – 408) _a	184.000 (80 – 368) _a
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	9.500 (6.300 – 17.000) _a	6.100 (5.400 – 9.600) _a
Segmentados ($\times 10^3/\text{mL}$)	7.644 (2.583 – 11.305) _a	3.843 (3.402 – 8.160) _a
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	2.550 (420 – 5.440) _a	1.296 (896 – 3.150) _a
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mL}$)	576 (168 – 1.890) _a	366 (96 – 784) _a
Monócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	186 (0 – 497) _a	392 (180 – 2.916) _a

Discussão

Pouco se sabe sobre a frequência da infecção por agentes da família *Anaplasmataceae* em carnívoros selvagens, no Brasil e no mundo. Com a

fragmentação do ambiente natural, extinção de mamíferos selvagens, presença de animais domésticos em íntimo contato com o homem, e alterações climáticas mundiais, o ciclo biológico dos vetores artrópodes vem sofrendo alterações nos seus hospedeiros específicos, criando novas relações hospedeiro-parasita (JORGE et al., 2010), tornando-se importante estudar a presença de agentes infecciosos transmitidos por estes vetores em carnívoros selvagens. Almeida (2011) relatou a primeira detecção molecular de *Anaplasmataceae* em cachorro do mato no Brasil, encontrando 6 animais positivos entre os 58 estudados, e André (2008) detectou a presença de DNA de *Anaplasmataceae* em 44 dos 267 carnívoros selvagens analisados. No presente estudo observou-se uma taxa alta de infecção por *Anaplasmataceae* dos felídeos (12/33) e canídeos (13/18) selvagens mantidos em cativeiro, provenientes da FJZB e NEX. Pode se observar assim que a infecção por esses hemoparasitas ocorre em carnívoros selvagens de cativeiro e pode estar sendo subdiagnosticada, ignorando-se o papel desses agentes como causadores de infecção e o papel dos carnívoros selvagens como sentinelas (ANDRÉ et al., 2012; FILONI et al., 2012). Oito felídeos e cinco canídeos selvagens foram positivos para *Anaplasmataceae*, porém foram negativos para as espécies estudadas (*E. canis* e *A. platys*), necessitando-se de estudos mais aprofundados para se identificar quais outras espécies estão presentes entre carnívoros selvagens de cativeiro no país.

Não foram encontradas mórulas de *Ehrlichia* spp ou de *Anaplasma platys* em nenhum dos esfregaços dos animais avaliados, frente a uma infecção de 36,4% (12/33) dos felídeos e 72,2% (13/18) dos canídeos por meio de análise molecular. Sabe-se que mórulas de *Ehrlichia* sp e *Anaplasma platys* podem ser encontradas por um curto período de tempo em leucócitos e plaquetas, respectivamente, todavia, elas são indetectáveis durante as fases subclínica e crônica da infecção (FERREIRA et al., 2007; NAKAGHI et al., 2008; CORREA et al., 2011). Evidencia-se assim que o diagnóstico direto, apesar de definitivo, é uma ferramenta de baixa sensibilidade, que depende de muitas variáveis como a experiência do microscopista e a fase da doença. Estes resultados corroboram com os achados de André (2008) que também não encontrou mórulas em esfregaços e borda de orelha de nenhum dos 267 carnívoros selvagens estudados.

A *Ehrlichia canis*, é o agente riquetsial que mais frequentemente infecta cães domésticos, tem distribuição mundial e é amplamente estudado nestes animais (FILONI et al., 2012). André em 2008 testou 267 carnívoros selvagens encontrando 28 animais positivos na análise molecular e Filoni et al, 2006 detectaram alto título de anticorpos anti-*E. canis* em uma Suçuarana brasileira de vida livre. A *E. canis* teve uma frequência de 16,7% nos felídeos e 30,76% nos canídeos selvagens estudados, não tendo sido pesquisadas outras espécies, podendo haver outras circulando nesses animais, sendo que também já foi descrita no Brasil em mamíferos selvagens a *E. chafeensis* (LABRUNA et al., 2002).

O *A. platys* é amplamente distribuído na população canina do Brasil, podendo afetar também felinos, acompanhando a distribuição do vetor, sendo um parasito intraplaquetário capaz de causar trombocitopenia (FERREIRA et al., 2007; LIMA et al., 2010) e foi mais frequente nos canídeos (**LG1, LG2, LG3 e LG4, RC2 e RC3 e CM3**) do que nos felídeos (**OP1 e J1**). Nenhum felídeo infectado apresentou contagem de plaquetas baixa contra seis canídeos trombocitopênicos (**LG3, LG5, LG6, RC2, RC3 e CM4**), todavia, a presença de trombocitopenia não foi significativa entre positivos e negativos. Tal fato pode ser explicado devido a diminuição no número de plaquetas causada por *A. platys* ser cíclica, ocorrendo um decréscimo no número de plaquetas circulantes poucos dias após a infecção, voltando ao normal 3 ou 4 dias depois e caindo novamente com 7 a 14 dias. A natureza cíclica da trombocitopenia acompanha a parasitemia do agente e tende a diminuir com o tempo e a cronificação da doença, podendo se encontrar frequentemente animais infectados sem alterações na contagem plaquetária, dependendo da fase da doença em que se encontram (INOKUMA et al., 2002; FERREIRA et al., 2007); , ou pela trombocitopenia estar sendo causada por outras infecções concomitantes. Os animais **LG5 e LG6** estavam trombocitopênicos, o primeiro apresentou infecção por *E. canis* e o segundo em nenhuma das espécies estudadas, ambos poderiam estar na fase subclínica da doença, como acima discutido.

Os animais **RC2 e LG4** apresentaram co-infecção por *E. canis* e *A. platys*. Co-infecção por múltiplos agentes riquetsiais não é incomum, já que várias espécies podem ser transmitidas pelos mesmos vetores artrópodes, como no caso da *E. canis*

e *A. platys* que são transmitidas pelo *R. sanguineus* (BREITSCHWERDT, 2008; DANTAS-TORRES, 2008). (DAGNONE et al., 2009) observou em seu estudo dois cães co-infectados por *E. canis* e *A. platys* em Jaboticabal, e André em 2008 encontrou 5 felídeos e 3 canídeos selvagens com co-infecção por esses hemoparasitas. Relata-se que animais domésticos co-infectados por agente riquetsiais podem apresentar um agravamento dos sinais clínicos e laboratoriais (BREITSCHWERDT, 2008), fato não observado nos animais nesse estudo.

Apenas um dos animais estudados, a **J1**, positiva para *A. platys*, apresentou secreção nasal e ocular, um sinal clínico inespecífico, que já foi relatado em animais infectados por riquetsias (FERREIRA et al., 2007; DANTAS-TORRES, 2008). Não é incomum detectar animais aparentemente saudáveis infectados com agentes *Anaplasmataceae*, tal fato poderia ser explicado pelos animais possivelmente estarem na fase subclínica da doença que pode levar de meses a anos e é caracterizada por persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos (BORIN et al, 2009; SOUSA et al., 2010). Outra explicação possível seria a presença de espécies menos patogênicas, as quais não foram identificadas no presente estudo.

Os canídeos **LG1**, **LG2**, **LG3**, **LG4**, **LG5**, **LG6**, **RC1**, **RC3** e **CM2** e os felídeos **OP2**, **J1**, **GP** e **GMP**, apresentaram anemia sendo que apenas três dos canídeos, **LG2**, **LG4** e **RC3**, que estavam anêmicos apresentaram sinais de regeneração medular, o que corrobora com a literatura a respeito de animais infectados os quais apresentarem anemia normocítica normocrômica arregenerativa, na fase aguda caracterizada por anemia induzida por doença inflamatória, e na fase crônica por destruição medular dos precursores hematopoiéticos (NEER et al., 2002; THRALL, 2007).

Dos canídeos, **RC1**, **RC2**, **RC3**, **RC4**, **LG4** e **CM4**, apresentaram leucopenia sendo que todos, exceto **RC3**, era causada por neutropenia. **RC1**, **RC3**, **CM2**, **LG5** e **LG6**, apresentaram linfopenia. Dos felídeos, **OP2**, **OP5** e **GMP** apresentaram neutropenia, **OP1** e **OP5** apenas leucopenia e **J1** e **GM** linfopenia. A linfopenia e neutropenia podem ocorrer por lise ou sequestro dos leucócitos pelos tecidos, e na

fase crônica da doença, por destruição de precursores medulares (MENDONÇA et al., 2005; NAKAGHI et al., 2008).

A **J1** apresentou leucocitose por neutrofilia, e **GP1** e **GM** apresentaram apenas neutrofilia, que pode ser explicada pelo estresse causado pela captura desses animais, deslocando neutrófilos do compartimento marginal para o circulante, ou por, menos provavelmente, estarem na fase aguda da doença (MENDONÇA et al., 2005; THRALL, 2007; BORIN et al, 2009).

Duas onças, **OP2** e **OP3**, apresentaram trombocitose. Xavier et al em 2009 verificaram em seu experimento com cães experimentalmente infectados por *Ehrlichia* spp que a trombocitose pode aparecer em cães logo depois de serem infectados, variando entre valores normais e trombocitopenia.

Os achados como anemia e diminuição ou aumento dos valores leucocitários e plaquetas foram esperados nos animais infectados por *Anaplasmataceae*, todavia já que essas alterações ocorrem dependendo da fase da doença e não estão presentes apenas nessas infecções, não foi encontrada significância estatística entre animais positivos e negativos. Isso significa que não houveram mais animais positivos com essas alterações do que animais negativos, podendo significar, estatisticamente falando pelo menos, que essas alterações se deveram ao acaso e não à infecção pelos agentes riquetsiais estudados. Todavia deve-se frisar a importância biológica dessas alterações encontradas nos animais diagnosticados positivamente com a infecção, que foram semelhantes àquelas encontradas em cães e gatos domésticos infectados. (DAGNONE et al., 2003; SOUSA et al., 2010). Sabe-se que infecção por agentes *Anaplasmataceae* causam uma fase aguda transitória com sintomatologia moderada à severa com febre, apatia, anorexia, perda de peso, palidez de mucosas, linfadenomegalia, esplenomegalia e alterações hematológicas inespecíficas como anemia normocítica normocrômica devido ao processo agudo inflamatório, trombocitopenia e leucocitose, que pode durar de 1 a 2 semanas, entrando numa fase subclínica que pode durar de meses a anos com ausência de sinais clínicos, podendo haver apenas uma persistente trombocitopenia. Na fase crônica os animais infectados apresentam comumente anemia normocítica normocrômica arregenerativa, pela

destruição dos precursores hematopoiéticos na medula óssea pelo agente, e uma trombocitopenia severa, apresentando prostração e distúrbios hemorrágicos, podendo levar a óbito (DANTAS-TORRES, 2008; LITTLE, 2010).

Quanto aos felídeos, cujas amostras foram colhidas de dois cativeiros diferentes, não houve um maior número de animais infectados comparando-se os dois locais de origem (FJZB e NEX). A única diferença significativa encontrada ocorreu quando se comparou as variáveis hematológicas dos grupos para *A. platys*, onde a média de número de linfócitos ($p = 0,05$) foi mais elevada nos felídeos positivos podendo ser explicada pela estimulação imunológica causada pelo agente infectante.

Conclusão

O presente estudo constatou uma frequência de canídeos 72,2% de canídeos selvagens infectados por agentes da família *Anaplasmatocae*, sendo 30,76% por *E.*

canis e 53,85% por *A. platys* e 22,22% não tiveram a espécie infectante identificada. Dos felídeos selvagens, 36,4% estavam infectados por *Anaplasmataceae*, sendo 16,7% por *E. canis* e 16,7% por *A. platys* e 24,24% não tiveram a espécie infectante identificada. Dois canídeos apresentaram co-infecção por *E. canis* e *A. platys*.

Fatores como sexo, idade, origem e espécie não foram relevantes para uma maior infecção por nenhum dos agentes estudados.

Os carnívoros selvagens estudados positivos para agentes *Anaplasmataceae* apresentaram alterações hematológicas características da infecção, todavia não foi encontrada significância quando comparados animais positivos e negativos.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A. P. Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Leishmania em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

ANDRÉ, M. R. Detecção molecular e sorológica de Ehrlichia canis e Babesia canis em felídeos silvestres brasileiros mantidos em cativeiro. São Paulo: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus Jaboticabal, São Paulo, 2008.

ANDRÉ, M. R. et al. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 3, n. 4, p. 247–253, 2012.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, 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 of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, p. 566–571, 2009.

BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular Evidence Supporting Ehrlichia canis-Like Infection in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 16, n. 6, p. 642–649, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B. Canine and Feline Anaplasmosis and Ehrlichiosis. 2008.

CORREA, E. S. et al. Molecular investigation of Ehrlichia spp. and Anaplasma platys in domestic cats: clinical signs, hematological and biochemical alterations. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 10, p. 899–909, 2011.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 117, n. 4, p. 285–290, 2003.

DAGNONE, A. S. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 4, p. 20–25, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

FERREIRA, R. F. et al. Anaplasma platys diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 5, n. 3, p. 113, 2007.

FILONI, C. et al. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 24, n. 1, p. 166–173, 1 jan. 2012.

INOKUMA, H. et al. Molecular survey of Ehrlichia infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Veterinary Parasitology*, v. 99, n. 4, p. 335–339, 31 ago. 2001.

INOKUMA, H. et al. Demonstration of Anaplasma (Ehrlichia) platys inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Veterinary parasitology*, v. 110, n. 1, p. 145–152, 2002.

- JORGE, R. S. P. et al. Ocorrência de Patógenos em Carnívoros Selvagens Brasileiros e suas Implicações para a Conservação e Saúde Pública. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 3, p. 686–710, 17 set. 2010.
- LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 8, p. 1133–1136, 2002.
- LIMA, A. C. Q. et al. Doenças Rickettsiais em Felinos Domésticos: Aspectos Hematológicos, Bioquímicos e Moleculares. Confict, 2010.
- LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 40, n. 6, p. 1121–1140, 2010.
- MACIEIRA, D. DE B. et al. Prevalence of Ehrlichia canis infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 1, p. 44–48, 1 mar. 2005.
- MENDONÇA, C. DE S. et al. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Biosci. j*, v. 21, n. 1, p. 167–174, 2005.
- MURPHY, G. L. et al. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, v. 79, n. 4, p. 325–339, 27 nov. 1998.
- NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*, v. 38, n. 3, p. 766–770, 2008.
- NEER, T. M. et al. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 16, n. 3, p. 309–315, 2002.
- SOUSA, V. R. F. et al. Clinical and molecular evaluation of dogs with ehrlichiosis. *Ciência Rural*, v. 40, n. 6, p. 1309–1313, 2010.
- THRALL, M. A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Rocca, 2007.
- VARELA, A. S. et al. Experimental infection of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) with Ehrlichia chaffeensis by different inoculation routes. *Journal of Wildlife diseases*, v. 39, n. 4, p. 881–886, 2003.
- XAVIER, M. S. et al. Plasmatic coagulation and platelet count in dogs uninfected and experimentally infected with Ehrlichia spp. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 5, p. 1049–1053, 2009.