



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**FATORES DE RISCO, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DETECÇÃO
MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Anaplasma platys* EM CÃES
DE PORTO ALEGRE/RS – BRASIL**

CAMILA SERINA LASTA

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FATORES DE RISCO, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DETECÇÃO
MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *anaplasma platys* EM CÃES
DE PORTO ALEGRE/RS – BRASIL

Autor: Camila Serina Lasta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias –
UFRGS - como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre

Orientador: Félix H. D. González

Porto Alegre, 2011.

L349f Lasta, Camila Serina

Fatores de risco, parâmetros hematológicos, detecção molecular e sorológica de *Erlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães de Porto Alegre/RS - Brasil. / Camila Serina Lasta; orient. Feliz Hilário Diaz González – Porto Alegre: UFRGS, 2011.

83 f. il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2011.

Catlogação na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Professora Joanne Belle Messik, exemplo de profissional e orientadora, por me receber na Universidade de Purdue.

Ao Professor Félix H. D. González, pela confiança e por ser um exemplo de profissional dedicado e correto.

Agradeço o Professor Alexander Welker Biondo pela confiança.

Agradeço muito minha amiga e “orientadora” Dea, que desempenhou vários papéis durante o curso deste experimento - um pouco mãe, amiga, colega. Sem você este trabalho não seria possível. Obrigada por tua confiança, paciência, carinho, ensinamentos e amizade.

À Ana Laura, sempre disposta a me ajudar. Obrigada pela companhia, risadas e por toda “ajuda molecular” durante minha estadia em Lafayette.

À Ana Márcia, obrigada pela força nos cálculos impossíveis e esclarecimento de dúvidas.

Ao Rafael Vieira, pelos controles positivos, dicas e artigos.

À Simone Tostes, profissional que eu admiro muito, pelo processamento das amostras, correções e sugestões.

Agradeço a todos colegas de laboratório - veterinários e estagiários - pelos bons e também pelos maus momentos e pela compreensão nos momentos de ausência. Aprendi algo com cada um de vocês; especialmente à Lu, pelo incentivo.

À Equipe da Polícia Ambiental de Porto Alegre, que nos acompanhou nas visitas ao Bairro Arquipélago - especialmente ao Capitão Rodrigo, incansável em sua luta pela defesa do Meio Ambiente.

À direção da Escola Alvarenga Peixoto e ao “Seu Vito”, que nos cederam espaço para o atendimento e coleta dos animais na Ilha Grande dos Marinheiros e Ilha do Pavão; e aos moradores do Bairro Arquipélago que nos receberam e participaram do Projeto.

Agradeço todos que participaram das coletas no Bairro Arquipélago, especialmente Vivi Pedralli, Fernanda, Magnus, Gabi e Lucas; na época estagiários e hoje profissionais competentes; além dos veterinários Rafael Stedile, Luciana Lacerda e Alejandra Barrera.

Obrigada por se interessarem em conhecer, examinar e tratar animais que não teriam condições de frequentar um Hospital ou Clínica Veterinária devido à vida dura e repleta de restrições de seus proprietários.

Ao Ricardo, pela paciência, carinho e apoio quando tudo ficou escuro. Pretinha e Fino, meus “companheiros de estudo”, obrigada por existirem na minha vida.

Agradeço e dedico este trabalho à minha mãe, Helena Serina Lasta, que sempre acreditou em mim e me apóia em qualquer situação.

“Todos os argumentos para provar a superioridade do homem não conseguem destruir este rude fato: no sofrimento, os animais são iguais a nós.”

Peter Singer

Camila Serina Lasta

FATORES DE RISCO, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *EHRlichia canis* E *ANAPLASMA PLATYS* EM CÃES DE PORTO ALEGRE/RS – BRASIL.

Aprovado em 10 de março de 2011

Félix H. D. González

Orientador e Presidente da Comissão

Regina Takahira

Membro da Comissão

Luis Sangione

Membro da Comissão

Sergio Ceroni

Membro da Comissão

FATORES DE RISCO, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Anaplasma platys* EM CÃES DE PORTO ALEGRE/RS – BRASIL

Autor: Camila Serina Lasta

Orientador: Félix H. D. González

RESUMO

Ehrlichia canis e *Anaplasma platys* são parasitas de células sanguíneas transmitidos por carrapatos de larga distribuição mundial. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de *E. canis* e *A. platys* em cães naturalmente infectados no município de Porto Alegre, RS, Brasil, através de técnicas sorológicas e moleculares; realizar análise molecular dos agentes através do sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA e compará-lo com sequências disponíveis no Genbank. Adicionalmente, avaliamos os parâmetros hematológicos e possíveis fatores de risco associados à infecção. Amostras de sangue foram coletadas de 146 cães residentes no Bairro Arquipélago, região suburbana de Porto Alegre e 53 cães mantidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Dentre os animais analisados, 27 (13,56%) apresentaram resultado positivo na nPCR e 20 (10,2%) apresentaram sorologia positiva para *A. platys*. Através da ferramenta BLASTn, as sequências obtidas neste estudo foram comparadas e mostraram similaridade de 99,75% a 100% em relação a outras sequências de *A. platys* disponíveis no Genbank. Neste estudo não foi observada a presença de *E. canis*. DNA do agente não foi amplificado em nenhuma das amostras analisadas através de técnicas moleculares, e tampouco foram detectados cães sororreagentes, indicando a baixa prevalência do agente no município. Ao comparar a prevalência de infecção/exposição entre as populações estudadas, não observamos diferença significativa entre elas. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos e fatores de risco analisados nos animais infectados ou expostos, exceto a contagem de basófilos, que foi associada positivamente com infecção por *A. platys*.

Palavras chave: Erliquiose, trombocitopenia cíclica, cães, PCR, sorologia.

RISK FACTORS, HEMATOLOGICAL PARAMETERS, SEROLOGIC AND MOLECULAR DETECTION OF EHRLICHIA CANIS AND ANAPLASMA PLATYS IN DOGS FROM PORTO ALEGRE/RS – BRAZIL

Author: Camila Serina Lasta

Advisor: Félix H. D. González

ABSTRACT

Erlichia canis and Anaplasma platys are tick borne disease which has a worldwide geographic distribution. The aim of this study was to detect the presence of E. canis and A. platys in naturally infected dogs in Porto Alegre/RS – Brazil by serological and molecular techniques, performing molecular analysis of the agents by sequencing of a fragment of the 16S rRNA and comparing it with sequences available in Genbank. Additionally, we evaluated the hematological parameters and potential risk factors associated with infection. Blood samples were collected from 146 dogs living in the Arquipelago neighborhood, a suburban area of Porto Alegre and 53 dogs from Control Centrer of Zoonosis (CCZ). Among the examined animals, 27 (13.56%) were positive by nPCR and 20 (10.2%) were seropositive for A. platys. Through the BLASTn, the sequences obtained in this study were compared and showed similarity of 99.75% to 100% as compared to other sequences of A. platys available in Genbank. None of the dogs showed antibodies or E. canis DNA, indicating the low occurrence of the agent in Porto Alegre. There were no significant differences between positive groups and hematological parameters, or among the risk factors evaluated, except basophils count was associated with A. platys infection.

Key words: Ehrlichiosis, cyclic thrombocytopenia, dog, PCR, serology.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Árvore filogenética da família Anaplasmataceae baseado nas sequências do gene 16S rRNA.....	07
Figura 2. Canine Snap 4Dx Test (Idexx).	25
Figura 3. Vista aérea do Bairro Arquipélago, município de Porto Alegre.	55
Figura 4. Aspecto das moradias e presença de entulhos, demonstrando a precária condição de vida dos moradores do Bairro Arquipélago.	56

ARTIGO

Figure 1. PCR results for <i>Anaplasma platys</i> detection in dog samples from Porto Alegre, Brazil.....	50
Figure 2. Frequency of positive dogs for <i>Anaplasma platys</i> in two analyzed populations according the diagnostic methods.....	50

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Characteristics of the two populations analyzed in this study.51

Table 2. Results obtained by nPCR and Snap 4Dx Test in dogs naturally exposed /infected.

.....51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	GERAL	4
2.2	ESPECÍFICOS	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	HISTÓRICO	5
3.1.1	<i>Ehrlichia canis</i>	5
3.1.2	<i>Anaplasma platys</i>	6
3.2	TAXONOMIA	6
3.2.1	<i>Ehrlichia canis</i>	6
3.2.2	<i>Anaplasma platys</i>	8
3.3	PATOGENIA.....	8
3.3.1	<i>Ehrlichia canis</i>	8
3.3.2	<i>Anaplasma platys</i>	10
3.4	ALTERAÇÕES CLÍNICAS	11
3.4.1	<i>Ehrlichia canis</i>	11
3.4.2	<i>Anaplasma platys</i>	13
3.5	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	14
3.5.1	<i>Ehrlichia canis</i>	14
3.5.2	<i>Anaplasma platys</i>	18
3.6	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	19
3.7	DIAGNÓSTICO	21
3.7.1	<i>Ehrlichia canis</i>	21

3.7.2	<i>Anaplasma platys</i>	24
4	RESULTADOS	26
4.1	ARTIGO	27
4.1.1	<i>Risk factors, hematological parameters, serologic detection and molecular characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from Southern Brazil</i>	27
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
6	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC) e atualmente é considerado o patógeno canino transmitido por carrapatos de maior importância na América Latina (Aguiar et al., 2007). É a doença transmitida por carrapatos de maior prevalência em cães em várias regiões no Brasil, principalmente em áreas urbanas e suburbanas, devido à abundante presença do principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Evans et al., 2000; Aguiar et al., 2007; Saito et al., 2008), combinado com a ocorrência de infecções persistentes e à falta de imunidade efetiva contra o agente (Aguiar et al. 2007). O agente reside no interior da célula hospedeira em corpúsculos de inclusão que proporcionam um ambiente favorável para sua sobrevivência (Dagnone et al., 2009) e a severidade da doença depende de fatores como: imunidade do hospedeiro, idade, raça e presença de infecções concomitantes (Vinasco et al., 2007). Apesar de apresentar distribuição mundial, as manifestações clínicas da infecção podem variar geograficamente (Dagnone et al., 2003; Vinasco et al., 2007),

Historicamente, infecções erliquiais foram consideradas espécie-específicas e acreditava-se que *E. canis* era capaz de infectar apenas caninos, assim como *E. risticii* (*Neorickettsia risticii*) infectaria apenas equinos e *E. chaffensis* apenas cervídeos e humanos. Em contrapartida, isolados geneticamente idênticos a *E. risticii* (Kakoma et al., 1994) e *E. chaffensis* (Yu et al., 2008) foram obtidos de cães. Nos últimos anos diversos pesquisadores relataram a ocorrência de isolados antigenicamente ou geneticamente similares à *E. canis* causando infecção em humanos em diferentes países, inclusive no Brasil (Perez et al., 1996; Calic et al., 2004; Costa et al., 2006). Em 1996, Perez e colaboradores relataram um isolado geneticamente similar à *E. canis* obtido de um veterinário na Venezuela; e recentemente, Perez e colaboradores (2006) relataram infecção erliquial em pacientes humanos com sinais clínicos. De acordo com sinais clínicos e

evidências sorológicas, Calic e colaboradores (2004) reportaram um caso de erliquiose monocítica humana no Brasil; enquanto Costa e colaboradores (2006) descreveram nove casos sintomáticos baseados nas mesmas evidências. Segundo Diniz e colaboradores (2007), seres humanos que residem em áreas urbanas no Brasil estão expostos à *E. canis* como consequência de sua exposição ao vetor. Estas observações sugerem que espécies erliquiais podem ser transmitidas a uma grande variedade de hospedeiros (Stich et al., 2008).

Além da sua importância em relação à saúde canina, a interação vetor-patógeno oferece modelos úteis para o estudo de bactérias transmitidas por carrapatos com potencial zoonótico (Duncan et al., 2005; Abarca et al., 2007; Diniz et al., 2007; Stich et al., 2008). Durante a fase subclínica os cães atuam como reservatório da doença (Waner et al., 1997; Roqueplo et al., 2009), assim, podem ser utilizados como sentinelas para detecção e caracterização de doenças zoonóticas (Duncan et al., 2005; Diniz et al. 2007, 2009; Stich et al., 2008), de forma que a detecção destes agentes na população canina é útil não apenas em relação ao controle e tratamento da doença, mas também para desenvolver estratégias para evitar que a infecção venha a atingir os seres humanos (Diniz et al., 2007; Amusatogui et al., 2008; Stich et al., 2008).

Anaplasma platys, o agente etiológico da Trombocitopenia Cíclica Canina (TCC) foi descrito pela primeira vez por Harvey e colaboradores em 1978, na Flórida, como inclusões basofílicas em plaquetas de cães trombocitopênicos e tem no cão seu reservatório primário (Harvet et al., 1978; Gaunt et al., 2010). Infecção por *A. platys* é descrita nas mesmas regiões geográficas onde há presença de *E. canis*, principalmente em regiões tropicais e subtropicais - e existem relatos de infecção concomitante com ambos agentes (Kordick et al., 1999; Suksawat et al., 2001; Diniz et al., 2009; Pantchev et al., 2009). O agente geralmente está associado a sinais clínicos inespecíficos ou doença subclínica e

parasitemia plaquetária que cursa com trombocitopenia a cada 1 a 2 semanas (Harvey et al., 1978; Harrus et al., 1997a), que pode ser severa o bastante para causar petéquias, equimoses e sangramentos, entretanto, a maioria dos animais é capaz de controlar a infecção imunologicamente (Neer & Harrus, 2006)

No Brasil, a presença de *E. canis* foi documentada pela primeira vez em Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais, em 1973 (Costa et al. *apud* Machado, 2004). No Rio Grande do Sul, Braccini e colaboradores (1992) registraram a presença de *E. canis* em amostras caninas em Porto Alegre (RS); em 1997 Seibert e colaboradores observaram ocorrência de 10,37% de animais positivos com menos de 1 ano de idade, no mesmo município. Ainda no Rio Grande do Sul, em diferentes municípios, Saito e colaboradores (2008) descreveram soropositividade de 4,8% dentre os cães avaliados. Até o momento não existem relatos a respeito da presença do agente *A. platys* no município de Porto Alegre, e tampouco trabalhos recentes sobre a ocorrência de *E. canis*. Desta forma, este estudo teve como objetivo principal investigar a ocorrência de *E. canis* e *A. platys* em cães naturalmente infectados em Porto Alegre através de técnicas sorológicas e moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar a erliquiose e a trombocitopenia cíclica canina através da pesquisa de anticorpos e DNA de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, a fim de conhecer a condição da população canina no município de Porto Alegre/RS quanto à presença dos agentes etiológicos.

2.2 Específicos

- Investigar a ocorrência dos agentes *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em caninos no Bairro Arquipélago e mantidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no município de Porto Alegre, RS;

- Comparar os métodos sorológico e molecular para diagnóstico de *E. canis* e *A. platys* em cães naturalmente infectados;

- Avaliar parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* no município de Porto Alegre;

- Avaliar a influência da faixa etária, gênero e outros possíveis fatores de risco nos animais positivos;

- Realizar uma análise molecular dos fragmentos das amostras positivas encontradas neste estudo, através da utilização de técnicas de sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA;

- Comparar as sequências dos fragmentos obtidos com aquelas apresentadas no GenBank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por intermédio da ferramenta BLASTn.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico

3.1.1 *Ehrlichia canis*

A infecção erliquial em cães foi descrita pela primeira vez em 1935, na Argélia, por Donatien e Lestoquard, que observaram microorganismos nas células mononucleares circulantes. Em 1945 o agente foi classificado como *Ehrlichia canis* por Mashkovsky, e na década de 1970 a espécie tornou-se conhecida nos Estados Unidos devido a um surto em cães do exército americano no Vietnã (Huxsoll et al., 1970, *apud* Machado, 2004). No final da década de 1960, quando *E. canis* foi classificada como Rickettsia, novas investigações surgiram para definir o papel do agente, pois anteriormente considerava-se que este organismo estava envolvido apenas no desencadeamento de doenças brandas, exceto em filhotes (Almosny & Massard, 2002). Somente na década de 1980, quando uma espécie de *Ehrlichia* foi reconhecida como causadora de infecção em seres humanos nos EUA, intensificaram-se as pesquisas para caracterização dos organismos erliquiais e outras espécies foram reconhecidas e classificadas (Paddock et al., 2003).

No Brasil, a presença de *E. canis* foi documentada pela primeira vez em Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais, em 1973 (Costa et al. *apud* Machado, 2004). Posteriormente, foi descrita no ano de 1976 no Estado do Rio de Janeiro; em 1978, em Jaboticabal, SP (Maregati *apud* Kavinski, 1988); e, em 1983, na cidade de São Paulo por Hagiwara e colaboradores. Na região Sul, em 1982, Yamamura & Vidotto relataram a infecção em Londrina (PR) (*apud* Seibert et al., 1997) e, em 1998 Kavinski e colaboradores documentaram um caso em Curitiba/PR. No Rio Grande Sul, existem relatos em 1992, quando Braccini e colaboradores registraram a presença de *E. canis* em amostras caninas em Porto Alegre (RS) e em 1997 Seibert e colaboradores observaram ocorrência

de 10% de animais positivos com menos de 1 ano de idade no mesmo município. Ainda no Rio Grande do Sul, em diferentes municípios, Saito e colaboradores (2008) descreveram soropositividade de 4,8% dentre os cães avaliados.

3.1.2 *Anaplasma platys*

Em 1978, nos EUA, Harvey e colaboradores descreveram inclusões basofílicas em plaquetas de cães trombocitopênicos, semelhantes à *Ehrlichia* sp. Verificou-se, através de infecção experimental, que os animais apresentavam tais microrganismos nas plaquetas em um intervalo de sete a doze dias, (Harrus et al., 1997a; Almosny & Massard, 2002; Beaufils et al., 2002; Aguirre et al., 2006). Atualmente, o agente é descrito em diversas partes do mundo, com alta incidência em regiões tropicais e subtropicais como América do Sul (Suksawat et al., 2001; Abarca et al., 2007), entretanto, também existem relatos da presença do agente na Europa (Aguirre et al., 2006; Amusatogui et al., 2008; Cardoso et al., 2010), Oriente Médio (Baneth et al., 1996; Harrus et al., 2010), África (Sanogo et al., 2003), Austrália (Bronw et al., 2001) e Ásia (Inokuma et al., 2000; Motoi et al., 2001). Infecção em humanos não foi comprovada, porém há relato de detecção de organismos intraplaquetários semelhantes à Rickettsiaceae em seres humanos na Venezuela (Arraga-Alvarado et al., 1999).

3.2 Taxonomia

3.2.1 *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). Por muitos anos, *E. canis* foi a única espécie ehrlichial reconhecidamente causadora de doença em cães, o que a tornou a espécie melhor descrita e estudada; entretanto, atualmente sabe-

se que diversas outras espécies de *Ehrlichia* infectam os cães tanto como hospedeiros primários como acidentais (Stich et al., 2008). Trata-se de uma bactéria gram-negativa, intracitoplasmática, pertencente à Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae*. É um microorganismo intracelular pleomórfico, com tropismo por células hematopoiéticas, principalmente aquelas do sistema fagocitário mononuclear (Dumler et al., 2001; Neer & Harrus, 2006) e que depende de artrópodes vetores para sua transmissão (Woody & Hoskins, 1991; Aguiar et al., 2007). De acordo com o atual esquema de classificação, baseado na sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA do organismo, o gênero *Ehrlichia* compreende cinco espécies: *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. canis*, (Dumler et al., 2001), sendo esta última a mais frequentemente observada em cães (Dagnone et al., 2003).

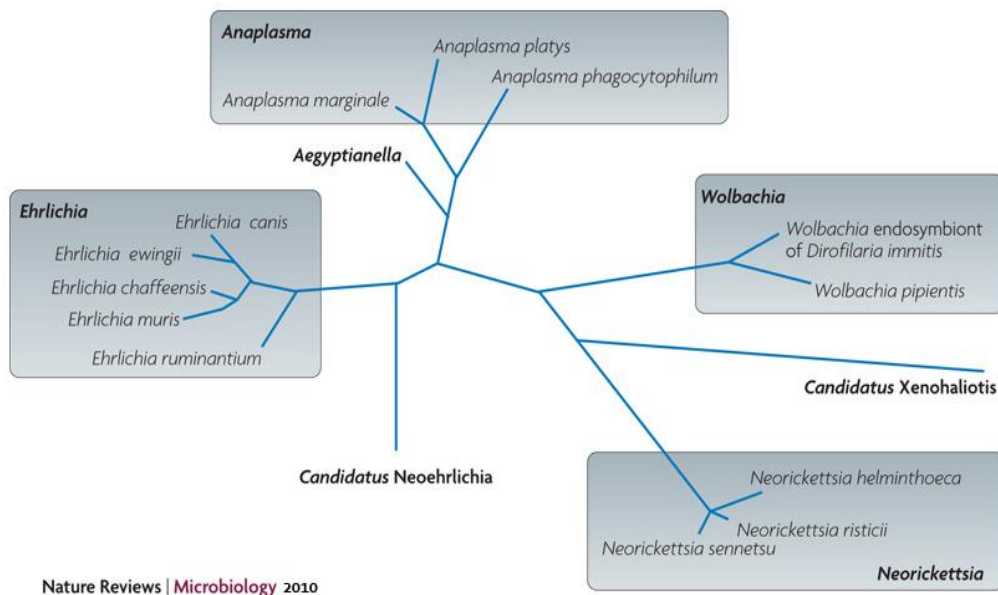


Figura 1. Árvore filogenética da família Anaplasmataceae baseado nas sequências do gene 16S rRNA. Disponível em: <http://riki-lb1.vet.ohio-state.edu/background/phylogram.php>

3.2.2 *Anaplasma platys*

A TCC é causada por uma pequena riquetsia originalmente classificada como *Ehrlichia platys* (Neer & Harrus, 2006). O agente caracteriza-se por inclusões basofílicas no interior das plaquetas chamadas de mórulas, que são compostas por um número variável de organismos (Harvey et al., 1978; Aguirre et al., 2006). Baseado em análises de sequências do gene 16S rRNA, atualmente o agente pertence ao gênero *Anaplasma*, sendo denominada *Anaplasma platys* (Dumler et al., 2001).

3.3 Patogenia

3.3.1 *Ehrlichia canis*

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de elucidar a patogênese da erliquiose canina, pois compreendendo melhor os mecanismos envolvidos é possível alcançar melhores resultados em relação ao tratamento e prognóstico da doença (Harrus et al., 1999; Stich et al., 2008). Outro ponto relevante, que desperta interesse a respeito da compreensão da patogenia na EMC é que assim se pode contribuir para a compreensão da erliquiose monocítica e granulocítica humana (Harrus et al., 1999).

Embora se tenha demonstrado experimentalmente que o carrapato *Dermacentor variabilis* é capaz de transmitir o agente (Johnson et al., 1998), o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* ainda é considerado o principal vetor de *E. canis*, assumindo grande importância devido sua ampla distribuição e por ter o cão como seu hospedeiro preferencial (Evans et al., 2000; Aguiar et al., 2007; Stich et al., 2008; Harrus et al., 2010). Nos hemócitos e glândula salivar do hospedeiro invertebrado as formas parasitárias do agente multiplicam-se assexuadamente e então migram para o trato digestivo do vetor. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando ninfas ou carrapatos adultos se

alimentam e sua secreção salivar infectada é então inoculada (McDade, 1990; Stich et al., 2008).

A patogênese da EMC é constituída por um período de incubação de 8 a 20 dias, quando os microorganismos se multiplicam por divisão binária em tecidos ricos em células mononucleares como linfonodos, baço, fígado e medula óssea (Harrus et al., 1998a; Neer & Harrus, 2006); em aproximadamente 10 dias (7 a 12 dias após a infecção) ocorre crescimento e replicação do agente originando as mórulas e então os microorganismos atingem outros órgãos e tecidos - como pulmões, rins, meninges e olhos. Ao se aderirem ao endotélio as células infectadas causam vasculite e infecção subendotelial (Codner et al., 1985, 1992; Rikihisa, 1991; Harrus et al., 1997c, 1999; Almosny & Massard, 2002). Na fase subclínica os cães tornam-se carreadores aparentemente saudáveis (Waner et al., 1997). Durante a fase crônica o parasita persiste intracelularmente e os cães desenvolvem pancitopenia e outras manifestações imunologicamente mediadas (Codner et al., 1985; Mylonakis et al., 2004). Baneth e colaboradores (2009) observaram um rápido aumento de DNA erliquial em células mononucleares no sangue e no baço entre 7 e 10 dias, e os cães tornaram-se severamente enfermos aos 12 dias (PI), o que sugere relação entre densidade de organismos teciduais e severidade das manifestações clínicas na fase aguda da EMC. Cães esplenectomizados infectados com *E. canis* apresentaram sinais clínicos mais brandos e parâmetros hematológicos significativamente mais altos comparados à cães infectados não esplenectomizados, sugerindo que o baço desempenha um papel importante na patogenia da EMC. Acredita-se que além de mecanismos imunomediados, mediadores inflamatórios esplênicos estejam envolvidos na patogenia da doença, de modo que a ausência destes fatores em animais esplenectomizados seja responsável pelo curso mais brando da infecção (Harrus et al., 1998b).

3.3.2 *Anaplasma platys*

Anaplasma platys multiplica-se apenas em plaquetas, e pode ser transmitida através de inoculação intravenosa de sangue de cães infectados (Martin et al., 2005; Aguirre et al., 2006). Em infecções naturais o modo de transmissão do agente da TCC não está totalmente elucidado. Acredita-se que o agente se adere na superfície plaquetária e então entra na plaqueta através de endocitose (Neer & Harrus, 2006). *A. platys* já foi detectada por PCR em *R. sanguineus* (Inokuma et al., 2000; Sanogo et al., 2003) e *R. turanicus* (Harrus et al., 2010), embora sua transmissão experimental ainda não tenha sido obtida (Simpson et al., 1991).

O período de incubação do agente é de 8 a 15 dias, quando ocorre grande número de plaquetas parasitadas em esfregaços sanguíneos. Após este período o número de plaquetas diminui tornando difícil o diagnóstico através de exame direto (Neer & Harrus, 2006; Edlestone et al., 2007). A infecção aguda é caracterizada por parasitemia plaquetária seguida de episódios de trombocitopenia que ocorre ciclicamente em intervalos de 7 a 14 dias (Harrus et al., 1997a; Alnosny & Massard, 2002; Neer & Harrus, 2006). Inicialmente a trombocitopenia se desenvolve como consequência do dano plaquetário sofrido pela replicação do agente (Neer & Harrus, 2006). As plaquetas infectadas são removidas da circulação por sequestro esplênico e mecanismos imunomediados podem estar envolvidos nos episódios trombocitopênicos cíclicos (Neer & Harrus, 2006; Eddlestone et al., 2007). Durante a fase aguda da infecção pode-se observar hiperplasia folicular dos linfonodos, plasmocitose e hemorragias esplênicas (Rikihisa, 1991).

3.4 Alterações Clínicas

3.4.1 *Ehrlichia canis*

Erliquiose monocítica canina está relacionada com uma variedade de formas clínicas e não há um padrão diagnóstico, o que muitas vezes faz com que esta doença seja um desafio na prática clínica (Dagnone et al., 2006). As manifestações clínicas variam de acordo com a fase da infecção (Harrus & Waner, 2010), quantidade de microorganismos inoculados, presença de enfermidades concomitantes (Neer & Harrus, 2006), características do hospedeiro como habilidade de montar resposta imune adequada, idade e raça (Rikihisa, 1991; Harrus et al., 1997b; Neer & Harrus, 2006) e pode haver inclusive variação geográfica (Dagnone et al., 2003; Neer & Harrus, 2006). É comum a ocorrência de co-infecções com outros patógenos transmitidos pelo mesmo vetor (Waner et al., 1997; Kordick et al., 1999; Suksawat et al., 2001; Dagnone et al., 2009). Um relato interessante de cães aparentemente saudáveis, porém infectados com três espécies erliquiais (*E. canis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*) foi publicado por Sukasawat e colaboradores (2001).

A doença pode se manifestar por uma grande variedade de sinais clínicos, sendo depressão, letargia, anorexia, perda de peso, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia, e tendências hemorrágicas as mais comuns (Harrus et al., 1997b, 1998a, 1999). Durante as fases aguda e crônica, diversas alterações como febre, perda de peso, sinais neurológicos, sangramentos espontâneo e edema - entre outras - podem ser observadas (Harrus et al., 1997b, 1999; Mylonakis et al., 2004). No México, cães infectados com uma variante mais patogênica de *E. canis* apresentaram febre ($> 40^{\circ}\text{C}$), anorexia, edema, desidratação, mucosas pálidas e perda de peso 19 dias após a infecção. O agente pôde ser detectado por PCR na circulação periférica 14 dias PI (Unver et al., 2009).

Menezes e colaboradores (2008) sugeriram que sinais como febre, desidratação, mucosas hipocoradas e petéquias e/ou sufusões em membranas mucosas ou na pele, trombocitopenia, leucopenia com linfopenia e eosinopenia podem servir como teste de triagem para o diagnóstico em cães com suspeita de erliquiose, principalmente em regiões onde o vetor está presente. Em estudo retrospectivo da casuística clínica de erlichiose, Moreira e colaboradores (2003) relataram como sinais clínicos mais frequentemente observados: febre (100%), anorexia, apatia, dor abdominal, dispnéia (26,9%) e linfadenopatia (27%) - particularmente dos linfonodos submandibular e poplíteo. Os autores ainda relataram alterações no sistema nervoso central em 19,2% dos animais infectados. Ataxia, paresia e paralisia ocorrem devido infiltração de células mononucleares ou hemorragias na meninge (Neer & Harrus, 2006). Dificuldade locomotora também foi observada com a mesma frequência (19,2%), sendo que 50% dos pacientes apresentaram edema em articulações, sinal associado principalmente à fase crônica da doença. Nakagui e colaboradores (2008) relatam como sinais clínicos mais frequentemente observados em cães com EMC, apatia (60,7%), anorexia (56,7%), membranas mucosas pálidas (43,3%), febre (43,3%), linfadenopatia (43,3%), hepatomegalia e/ou esplenomegalia (43,3%), hemorragias (petéquias e epistaxe) (33,3%) e uveíte (40%). Os primeiros sinais clínicos observados por Moreira e colaboradores (2005) no 15º dia PI em cães experimentalmente infectados foram hipertermia (40°C), descarga óculo nasal e perda de peso. Em outro estudo onde cães foram infectados experimentalmente, Castro e colaboradores (2004) observaram os primeiros de sinais clínicos ente os dias 10 e 14 PI. Os animais infectados apresentaram pirexia (acima de 41°C) por 6 a 8 dias, mucosas pálidas, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, emaciação e perda de pelos.

Em cães não tratados ou que recebem tratamento inadequado instala-se a fase subclínica (Harrus et al., 2004), quando o animal parece estar recuperado, mas permanece

soropositivo e pode apresentar apenas discretas alterações laboratoriais como trombocitopenia e anemia leves (Waner et al., 1997; Harrus et al., 2004) e hiperglobulinemia durante meses a anos (Codner et al., 1985, Harrus et al., 1996b). A fase crônica da EMC é de prognóstico desfavorável. Depressão, perda de peso acentuada, emaciação, linfadenopatia, pirexia e hemorragias são comumente observadas nesta fase, (McDade, 1990; Mylonakis et al., 2004), além da ocorrência de infecções secundárias que podem levar à morte (Moreira et al., 2003).

A necropsia de cães com EMC revelou mucosas pálidas, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, edema e ascite, que pode ser resultado de vasculite ou hipoalbuminemia associada à hiperglobulinemia. Lesões microscópicas incluíram hiperplasia linforreticular nos linfonodos e baço, acúmulo de células mononucleares e degeneração gordurosa no fígado e glomerulonefrite (Gal et al., 2008). Vasculite é um achado consistente em casos de EMC, e acredita-se que a inflamação observada nos vasos sanguíneos desempenhe um papel na patogênese da doença (Harrus et al., 1999; Castro et al., 2004). Danos hepáticos, renais e no SNC ocorrem devido compressão circulatória /ou alterações imunomediadas (Castro et al., 2004). Um outro estudo, em que cães foram experimentalmente infectados com uma cepa mais patogênica de *E. canis*, apresentou resultados de necropsia compatíveis aos já descritos, como linfadenopatia, vasculite, hemorragias e infiltração plasmocítica linfocitária em vários órgãos (Unver et al., 2009).

3.4.2 *Anaplasma platys*

Cães infectados com *A. platys* normalmente não são afetados clinicamente mesmo na presença de trombocitopenia severa (Harvey et al., 1978). Alguns pacientes podem apresentar sinais clínicos discretos, como leve aumento da temperatura retal ou hematoquesia (Neer & Harrus, 2006). Por outro lado, parece que existem cepas mais

patogênicas do agente em alguns países como França, Espanha e Tunísia, onde cães infectados exibem sinais clínicos como febre, linfadenopatia, hemorragia, letargia, mucosas pálidas, anorexia e perda de peso (Beaufils et al., 2002; Aguirre et al., 2006; Ulutas et al., 2007).

3.5 Alterações Laboratoriais

3.5.1 Ehrlichia canis

As principais alterações hematológicas observadas em casos de EMC incluem trombocitopenia, anemia e leucopenia leves durante a fase aguda, trombocitopenia leve na fase subclínica, e pancitopenia durante a fase crônica grave (Harrus et al., 1997b; Waner et al., 1997; Mylonakis et al., 2004; Stich et al., 2008). Tais alterações hematológicas podem ser decorrentes de mecanismos imunomediados, alteração do metabolismo protéico devido lesão hepática e supressão da medula óssea (Castro et al., 2004; Unver et al., 2009).

Ao avaliar o perfil clínico e laboratorial de cães com erliquiose monocítica, Menezes e colaboradores (2008) concluíram que achados hematológicos como anemia, leucopenia, neutropenia, eosinopenia, linfopenia e trombocitopenia foram significantes ($p < 0,05$). Foi confirmada anemia em 60% dos animais positivos pela PCR e, destes, 73,33% apresentaram anemia do tipo normocítica e normocrômica. Quanto aos parâmetros leucocitários, os autores observaram decréscimo dos valores absolutos de quase todos os tipos de leucócitos, o que sugere supressão medular temporária ou destruição imunomediada. Outra característica marcante foi a ocorrência de trombocitopenia em 60% dos pacientes analisados, além de anisocitose plaquetária e macroplaquetas, sugerindo que, apesar da tendência à trombocitopenia, há trombocitopoeise ativa (Harrus et al. 1997c; Waner et al., 2000). Variante mais patogênica descrita no México causou trombocitopenia

severa, leucopenia (neutropenia e linfopenia), diminuição do hematócrito, eritrócitos e hemoglobina 21 dias PI (Unver et al., 2009). Johnson e colaboradores (1998) observaram trombocitopenia, eritrofagocitose e monócitos com citoplasma vacuolizado 1 a 4 dias antes da detecção de mórulas no esfregaço sanguíneo de cães experimentalmente infectados.

Estudo retrospectivo que avaliou cães com erliquiose concluiu que as alterações hematológicas mais frequentemente observadas em casos de EMC foram anemia (70,3%), trombocitopenia (50%) e leucopenia (30%) (Moreira et al., 2003). Alterações hematológicas significativas como diminuição do número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e leucócitos também foram descritas por Castro e colaboradores (2004) durante a fase aguda da doença em cães experimentalmente infectados dentro de 2 a 4 semanas PI. Os autores sugerem que supressão temporária da atividade da medula óssea pode estar associada aos casos de EMC, pois no referido estudo observou-se uma tendência de retorno à normalidade dos valores hematológicos. Os resultados mais expressivos encontrados por Borin e colaboradores (2009), ao avaliarem cães naturalmente infectados, foram desvio nuclear de neutrófilos à esquerda e eosinopenia, enquanto Castro e colaboradores (2004) relatam aumento do número de neutrófilos e monócitos e diminuição do número de eosinófilos (2º semana) e linfócitos (3º semana) PI.

Durante a fase crônica as principais alterações hematológicas observadas em estudo conduzido por Mylonakis e colaboradores (2004) foram anemia e trombocitopenia em todos os cães avaliados e pancitopenia em 17/19 (90%) dos casos. Estudo retrospectivo nos Estados Unidos apontou 77% de cães trombocitopênicos com erliquiose (Frank & Breitschwerdt, 1999), enquanto em Israel trombocitopenia foi encontrada em 27% dos cães (Baneth et al., 1996), o que pode ser devido a diversidade das cepas ou mesmo viés de seleção, já que cães trombocitopênicos são mais testados para erliquiose (Dagnone et al., 2003).

No Brasil, estudo conduzido por Bulla e colaboradores (2004) apontou 30,9% dos cães trombocitopênicos como positivos para *E. canis* através da PCR. Em outro estudo brasileiro, onde apenas 19,7% das amostras de cães trombocitopênicos mostraram-se positivas para *E. canis* os autores sugerem que trombocitopenia secundária à erliquiose não é tão comum na região estudada quanto em outras regiões (Dagnone et al., 2003). Cepas brasileiras de *E. canis* parecem resultar na presença de anemia, mas nem sempre de trombocitopenia (Dagnone et al., 2003; Castro et al., 2004)

Os mecanismos envolvidos na patogenia da trombocitopenia incluem consumo de plaquetas em decorrência da vasculite, sequestro esplênico, produção de fator de inibição da migração plaquetária e diminuição da meia vida plaquetária devido destruição imunomediada (Smith et al., 1975; Harrus et al., 1996a; Waner et al., 2000; Neer & Harrus, 2006). Destruição plaquetária ocorre de forma acelerada e é apontada como a causa primária da trombocitopenia em casos de infecção por *E. canis* (Smith et al., 1975) – em cães infectados a meia vida plaquetária diminui de 9 para 4 dias - entretanto, a tendência a sangramentos observada em cães infectados pode estar relacionada não apenas à trombocitopenia, mas também à disfunção plaquetária, já que cães que se recuperam do episódio trombocitopênico podem continuar apresentando tendências hemorrágicas (Harrus et al., 1996a; Frank & Breitschwerdt, 1999; Brandão et al., 2006). Estudo brasileiro cujo objetivo foi determinar a ocorrência e duração de disfunção plaquetária em cães experimentalmente infectados com *E. canis* concluiu que a tendência a sangramentos observada em cães infectados não se deve apenas à trombocitopenia, mas também à disfunção plaquetária, pois o grupo infectado apresentou diminuição do número de plaquetas, bem como diminuição da agregação plaquetária quando comparado ao grupo controle (Brandão et al., 2006).

As principais alterações bioquímicas em casos de EMC incluem hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, e hipergamaglobulinemia (Harrus et al., 1997c; Roqueplo et al., 2009). Em estudo conduzido por Roqueplo e colaboradores (2009) houve associação entre a deterioração dos parâmetros bioquímicos e o título de anticorpos anti *E. canis*. Ao contrário do estudo realizado por Harrus e colaboradores (1996b), em que os pesquisadores não observaram associação entre níveis de gamaglobulinas e título de anticorpos, no estudo conduzido por Roqueplo e colaboradores (2009), os níveis de gamaglobulinas apresentaram-se significativamente aumentados em animais com altos títulos de anticorpos em relação aos outros cães soropositivos. Os autores sugerem que há relação entre produção de anticorpos e concentração de gamaglobulinas (Roqueplo et al., 2009). Shimada e colaboradores (2002) relataram aumento na concentração de proteína C reativa em cães infectados com *E. canis* entre 4 e 16 PI.

Mylonakis e colaboradores (2010) descreveram um caso raro de hepatite severa associada à EMC, onde um cão da raça Pastor Alemão apresentava hipoalbuminemia, normoglobulinemia, hiperbilirrubinemia e aumento da atividade das enzimas ALT e FA. Fibrose portal, infiltrado inflamatório, hemorragia portal e congestão vascular foram descritos na histopatologia do fígado. Interessantemente, a citologia hepática revelou inclusões citoplasmáticas em linfócitos e macrófagos compatíveis com *Ehrlichia* sp. Somente após 7 dias, DNA de *Ehrlichia canis* foi amplificado do sangue e então na sexta semana pós apresentação para atendimento o paciente apresentou sorologia positiva para *E. canis*. Quarenta e oito horas após o início do tratamento as alterações bioquímicas começaram a retornar aos valores de referência e estavam normalizadas 40 dias depois.

O aumento da permeabilidade vascular e consequente perda de albumina é a causa da hipoalbuminemia durante a fase aguda da infecção (Harrus et al., 1997c), juntamente com perda de sangue e/ou diminuição da produção devido dano hepático (Unver et al.,

2009). Na fase crônica, a perda de albumina ocorre principalmente através dos rins quando há glomerulonefrite (Codner, et al., 1992; Frank & Breitschwerdt, 1999). Além disso, a diminuição da concentração de albumina é um mecanismo compensatório decorrente da hiperglobulinemia, de modo a manter o equilíbrio oncótico e prevenir hiperviscosidade sanguínea (Woody & Hoskins, 1991).

3.5.2 *Anaplasma platys*

Achados laboratoriais em casos de infecção por *A. platys* incluem - além de episódios cíclicos de trombocitopenia - anemia inconstante, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (Harvey et al., 1978; Bradfield et al., 1996), enquanto a contagem de leucócitos totais parece não variar (Gaunt et al., 2010). Cães experimentalmente infectados desenvolveram trombocitopenia marcante e presença de mórulas intraplaquetárias em 7 dias (Edllestone et al., 2007; Gaunt et al., 2010), mas a contagem de plaquetas aumentou gradualmente a partir do 75º dia (Gaunt et al., 2010). Em estudo desenvolvido por Edllestone e colaboradores (2007), a contagem de plaquetas diminuiu dentro de 7 dias, aumentou até o dia 28 PI, mas permaneceu abaixo dos valores de referência. A trombocitopenia é causada primeiramente pela proliferação do agente (Woody & Hoskins, 1991; Dagnone et al., 2003; Neer & Harrus, 2006), mas também pode envolver mecanismos imunomediados (Neer & Harrus, 2006), sequestro esplênico e fagocitose plaquetária por macrófagos no baço, fígado e medula óssea (Edllestone et al., 2007) e acredita-se na ocorrência de disfunção plaquetária (Harvey et al., 1978; Baker et al., 1988; Gaunt et al., 1990).

Em estudo conduzido por Gaunt e colaboradores (2010), cães infectados simultaneamente com *E. canis* e *A. platys* apresentaram anemia e trombocitopenia mais

severas quando comparados aos grupos que receberam apenas *E. canis* ou *A. platys*. Durante alguns períodos do experimento o hematócrito mostrou-se significativamente mais baixo nos cães co-infectados em relação àqueles inoculados apenas com *E. canis*, sugerindo que *A. platys* pode exercer um papel de potencializador da infecção. Anemia marcante também foi observada em cães infectados com *A. platys* e posteriormente desafiados com *E. canis*. Beaufils e colaboradores (2002) relataram um caso em que os achados hematológicos indicaram leucocitose devido a linfocitose e monocitose, presença de monócitos ativados e macroplaquetas. Ferreira e colaboradores (2008) encontraram diferença significativa ao comparar cães PCR positivos e negativos para infecção por *A. platys*, sendo que os primeiros apresentaram contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito e número de plaquetas menores em relação aos últimos. Adicionalmente, os autores observaram que todos os pacientes positivos apresentavam trombocitopenia.

3.6 Aspectos Imunológicos

Sabe-se que, ao mesmo tempo em que cães infectados com *E. canis* desenvolvem níveis consideráveis de anticorpos específicos, estes não são hábeis na eliminação do microorganismo e tampouco conferem proteção contra futuras infecções (Harrus et al., 1996b; Hess et al., 2006). Através de modelos experimentais, mostrou-se que a produção exagerada de FNT e IL-10 está associada a casos fatais de erliquiose (Ismail et al., 2007). Sugere-se que uma resposta imune exagerada por parte do hospedeiro seja responsável pela ocorrência de doença severa (Ismail et al., 2007), sendo aceito que a patogênese da EMC está mais relacionada à resposta imune do que aos efeitos diretos do agente no hospedeiro (Harrus et al., 1996b).

Apesar dos altos níveis de gamaglobulinas observados em casos de EMC, interessante, não há relação direta entre a produção de gamaglobulinas e o título de

anticorpos; sugerindo que o agente *E. canis* induz a produção de anticorpos não específicos e que estes não são responsáveis pelo aumento nos níveis de gamaglobulinas (Harrus et al., 1996b). Este fenômeno é descrito em doenças que cursam com prolongada estimulação antigênica e corrobora a ocorrência de uma resposta imune exagerada, porém de efeito protetor limitado. Cães esplenectomizados, por exemplo, apresentam alterações clínicas e hematológicas mais brandas em relação àqueles intactos, comprovando o envolvimento de mecanismos imunológicos na patogênese e severidade da EMC, pois o baço é uma importante fonte de anticorpos e macrófagos. Com a esplenectomia se evita a produção exagerada de anticorpos, resultando em doença branda (Harrus et al., 1998b).

A eliminação do agente requer mecanismos celulares e humorais; e embora a imunidade mediada por células normalmente desempenhe um papel importante na proteção contra microorganismos intracelulares, no caso de patógenos erliquiais sabe-se que a resposta imune humoral assume maior importância (Winslow et al., 2000, 2003; Yager et al., 2005). Por outro lado, Hess e colaboradores (2006) afirmam que anticorpos anti *E. canis* não desempenham um papel central na eliminação do agente, pois os autores observaram 2 grupos de cães experimentalmente infectados, e não houve diferença entre os títulos de anticorpos produzidos por aqueles cães que eliminaram o agente e aqueles que permaneceram persistentemente infectados. Ou seja, mesmo com a ocorrência de uma resposta imune humoral exagerada, muitos cães não conseguem eliminar o agente, tornando-se carreadores sintomáticos crônicos – o que pode contribuir na manutenção do agente na natureza - e esta mesma resposta humoral está relacionada diretamente com a patogênese da doença, especialmente na fase crônica (Hess et al., 2006).

3.7 Diagnóstico

3.7.1 *Ehrlichia canis*

Idealmente, o diagnóstico da EMC deve ser baseado na combinação dos achados clínicos, hematológicos e citológicos, de sorologia e ainda PCR (Waner et al., 2001; Neer & Harrus, 2006; Vinasco et al., 2007; Harrus & Waner, 2010). O diagnóstico clínico pode ser confirmado por meio do achado de mórulas e inclusões de *Ehrlichia* spp. em leucócitos de esfregaços sanguíneos, aspirados de baço, medula óssea e linfonodos (Mylonakis et al., 2004; Neer & Harrus, 2006; Harrus & Waner, 2010). Este é um método de baixo custo, mas apresenta limitações importantes devido a sua baixa sensibilidade, em virtude da baixa parasitemia (Harrus et al., 1997c, 2004; Stich et al., 2008), principalmente nas fases subclínica e crônica, quando a visualização de corpúsculos e mórulas é realmente difícil (Moreira et al., 2003; Mylonakis et al., 2003). O exame da capa leucocitária pode aumentar a sensibilidade do teste (Mylonakis et al., 2003). A presença de mórulas pode ser identificada cerca de 12 e 15 dias após a infecção no sangue periférico e na medula óssea, respectivamente (Castro et al., 2004; Moreira et al., 2005); entretanto, faz-se importante ressaltar que a ausência de parasitas no esfregaço sanguíneo não exclui a possibilidade de infecção (Woody & Hoskins, 1991).

O cultivo celular é uma opção que oferece um diagnóstico bastante preciso, porém demanda tempo, grande quantidade de amostra e mão-de-obra especializada, o que explica seu uso restrito como método diagnóstico, sendo usado principalmente em laboratórios de pesquisa (Waner et al., 2001; Mylonakis et al., 2003; Stich et al., 2008; Harrus & Waner, 2010). Testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são bastante utilizados em casos de suspeita clínica e também em pesquisas quanto à prevalência do agente; além do diagnóstico molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Stich et al., 2008; Harrus & Waner, 2010).

Canine Snap 4Dx Test (Idexx Lab.) é um kit de diagnóstico rápido baseado na metodologia ELISA que detecta anticorpos contra *E. canis* e *Anaplasma* sp., e segundo alguns trabalhos publicados apresenta bons resultados comparado à PCR e à RIFI (Bowman et al., 2009; Diniz et al., 2009; Pantchev et al., 2009). Em estudo que utilizou Snap Test e PCR como métodos diagnósticos, 81,5% das amostras apresentaram resultado positivo para *E. canis* em ambos (Diniz et al., 2009). Em outro trabalho, que comparou 3 kits de ELISA com a técnica de RIFI, não foram observadas diferenças significativas entre os testes, de modo que os autores concluíram que os primeiros são específicos e sensíveis, principalmente para títulos maiores que 1:320. Neste trabalho, Snap Test apresentou sensibilidade e especificidade de 71% e 100%, respectivamente, quando comparado à RIFI (Harrus et al., 2002). Bélanger e colaboradores (2002) também compararam testes rápidos ELISA e RIFI e observaram resultados semelhantes, onde o Snap Test apresentou sensibilidade e especificidade de 79,2% e 100%, respectivamente. Os mesmos autores afirmam que além de comprovada sensibilidade e especificidade, os testes rápidos de ELISA ainda apresentam a vantagem de resultados rápidos, podendo ser utilizados para diagnóstico nas clínicas veterinárias e são de fácil interpretação para a detecção de anticorpos no soro, ao contrário da pesquisa de anticorpos anti-*E.canis* pela técnica de imunofluorescência indireta, que apesar de ser considerada “Padrão Ouro”, está sujeita a limitações como a subjetividade do observador, laboratório equipado e mão-de-obra especializada (Waner et al., 2001; Bélanger et al., 2002; Harrus et al., 2002).

Apesar de bastante utilizados na rotina médica, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, levando-se em consideração as manifestações clínicas e dados epidemiológicos (Waner et al., 2001). Resultados falso-negativos são observados em estágios iniciais da doença e por isso recomenda-se a realização de teste pareado, com mais de 3 semanas de intervalo entre eles (Harrus et al., 2002; Nakaghi et al., 2008; Harrus &

Waner, 2010). Além disso, a sorologia não diferencia entre exposição prévia e infecção ativa (Bélangier et al., 2002; Vinasco et al., 2007; Pantchev et al., 2009), títulos aumentados podem ser observados por até 11 meses após tratamento (Harrus et al., 1998a) e existe a ocorrência de reação cruzada entre as diferentes espécies erliquiais (Rikihisa, 1991; Waner et al., 2001; Bélangier et al., 2002; Nakagui et al., 2008; Harrus & Waner, 2010). DNA erliquial pode ser amplificado a partir do 4º dia pós infecção (Iqbal et al., 1994), enquanto a soroconverção ocorre em torno de 24 dias PI (Gaunt et al., 2010). Segundo alguns autores, a PCR tem se mostrado uma técnica sensível, específica e confiável em relação à sorologia principalmente porque esta não é capaz de distinguir entre infecção ativa e exposição prévia (Iqbal et al., 1994; Wen et al., 1997; Waner et al., 2001; Dagnone et al., 2009).

Ao comparar técnicas diagnósticas, Nakaghi e colaboradores (2008), concluíram que a sorologia e a nested PCR (nPCR) são os testes mais adequados para confirmar o diagnóstico de EMC, no entanto, os autores ressaltam que estes devem ser utilizados como dados complementares à avaliação clínica e hematológica. Sorologia tem um papel importante na fase subclínica e crônica, enquanto nPCR é recomendada na fase aguda e, especialmente, na identificação da espécie *Ehrlichia*. Neste trabalho, o diagnóstico direto através da pesquisa de mórulas foi possível em apenas 3,3% das amostras analisadas, enquanto 63,3% das amostras mostraram-se positivas por RIFI, 70% por Dot-ELISA e 53,3% através de nPCR, sem diferenças significativas entre as 3 últimas técnicas. Wen e colaboradores (1997) demonstraram que a nPCR apresenta ótima especificidade e sensibilidade na detecção de *E. canis*, sendo inclusive mais sensível que a RIFI em estágios iniciais da infecção; entretanto os autores afirmam que com sorologia e nPCR utilizados em conjunto obtêm-se um diagnóstico mais confiável e preciso.

DNA de *E. canis* e *A. platys* pôde ser amplificado de tecidos obtidos até 72 horas pós- morte. Amostras de sangue e linfonodos apresentaram melhores resultados (Gal et al., 2008). Na fase aguda da EMC, PCR de sangue e baço parecem ser igualmente eficazes (Baneth et al., 2009), porém após tratamento com doxiciclina o agente é rapidamente eliminado da circulação (Harrus et al., 2004). Durante as fases subclínica e crônica o baço é o órgão mais indicado para obtenção de amostras destinadas à PCR, inclusive na avaliação do tratamento, a fim de assegurar-se da eliminação do agente (Harrus et al., 2004).

3.7.2 *Anaplasma platys*

O diagnóstico direto da TCC através do exame do esfregaço sanguíneo é difícil principalmente devido à natureza cíclica da infecção (Martin et al., 2005). É importante ressaltar que para pesquisa direta faz-se necessário pessoal treinado, pois é necessário diferenciar as mórulas de *A. platys* de granulações plaquetárias inespecíficas, como aquelas observadas durante episódios inflamatórios (Ferreira et al., 2007).

Estudo comparativo entre visualização direta em esfregaço e PCR concluiu que, embora a PCR seja um método mais específico na identificação do agente, não houve diferença significativa entre os métodos (Ferreira et al., 2007). Estudo semelhante apresentou resultados contraditórios: apenas 21% dos cães apresentaram resultado positivo na análise do esfregaço sanguíneo, enquanto 55% dos cães foram considerados positivos pela nPCR, demonstrando grande ocorrência de resultados falso-negativos quando se utiliza apenas o esfregaço sanguíneo como método diagnóstico (Ramos et al., 2009).

Apesar da RIFI ser o teste mais utilizado no diagnóstico laboratorial de TCC, esta apresenta reação cruzada com *Anaplasma phagocitophilum* (Inokuma et al., 2002). A ocorrência de resultados falso-positivos devido a exposição ao agente ou falso-negativos em estágios iniciais da infecção (Rikihisa, 1991; Harrus & Waner, 2010) tornam a sorologia um método que demanda atenção na interpretação dos resultados por parte do médico veterinário. A PCR, e principalmente a nPCR, é um teste sensível e específico que detecta infecção experimental e natural de *A. platys* em cães (Brown et al., 2001; Martin et al., 2005; Ferreira et al., 2007) e segundo Huang e colaboradores (2005) é considerado o teste mais confiável no diagnóstico da TCC. Resultado positivo na sorologia foi observado 14 dias pós-infecção experimental em cães, enquanto a presença de mórulas foi observada entre 7 a 10 dias. No mesmo estudo a PCR apresentou resultados positivos entre os dias 4 e 14, mas após este período os resultados tornaram-se intermitentes devido à saída das células infectadas da circulação. Os autores sugerem que após a saída das células infectadas da circulação, PCR de amostras de baço e medula óssea pode apresentar resultado positivo (Eddlestone et al., 2007). Comparando os resultados obtidos no Snap 4Dx Test (Figura 2) e na PCR, houve concordância de 91% nos resultados: apenas 16 amostras sororreagentes contra *Anaplasma* apresentaram resultado negativo na PCR, e 5 amostras PCR positivas para *A. platys* foram negativas no Snap 4Dx Test (Diniz et al., 2009).



Figura 2. Canine Snap 4Dx Test (Idexx). Resultado positivo para *A. phagocytophilum*

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de artigo científico, que será submetido para publicação em periódico da área.

Risk factors, hematological parameters, serologic detection and molecular characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from Southern Brazil

Camila Serina Lasta e colaboradores

4.1 ARTIGO

4.1.1 Risk factors, hematological parameters, serologic detection and molecular characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Southern Brazil

Camila Serina Lasta¹, Joanne Belle Messick², Andrea Pires Santos², Simone Tostes Oliveira³, Alexander Welker Biondo³, Rafael Vieira⁴, Magnus Larruscain Dalmolin¹, Félix Hilário Díaz González¹.

¹Department of Veterinary Clinical Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, EUA. ³Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil. ⁴Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Abstract: The aim of this study was to determine the occurrence, hematological parameters and risk factors associated with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* exposure or infection in dogs from Porto Alegre, Southern Brazil. *E. canis* and *A. platys* nPCR was used to amplify DNA from peripheral blood and DNA sequencing was performed to confirm the agent identity. Furthermore, dog samples were examined for the presence of specific antibody by ELISA. A total of 199 samples were collected from two distinct dog populations. From the 199 dogs analyzed, 27/199 (13.56%) were positive by PCR and further sequence whereas 20/196 (10.2%) was positive by serology for *A. platys*. There were no statistically significant differences for hematological parameters between positive

groups, or among the risk factors evaluated, except for basophils count in *A. platys* infection. None of the dog showed antibodies anti *E. canis* or *E. canis* DNA, indicating the low occurrence of the agent in Porto Alegre. In our better knowledge, molecular characterization of *A. platys* in Southern Brazil has never been reported and the present study provides preliminary data regarding the presence of *A. platys* in dogs in Porto Alegre. Our results indicate that hematological parameters were not sufficient to confirm *E. canis* or *A. platys* infection.

Keywords: *Anaplasma platys*; *Ehrlichia canis*, dog, Brazil, PCR, sequence.

1. Introduction

Tick-borne bacteria are obligate intracellular pathogens of domestic dogs and potentially are of public health significance (Beall et al., 2008). Several species of the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* have been reported to cause disease in dogs (Cardoso et al., 2010). Canine monocytic ehrlichiosis (CME) and canine infectious cyclic thrombocytopenia (CICT), common vector-borne canine diseases in Brazil, are caused by *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*, respectively (Dantas-Torres, 2008).

E. canis is an obligate intracellular bacterium that infects monocytes and has a worldwide distribution which is associated with serious and sometimes fatal disease (Waner et al., 2001; Neer and Harrus, 2006). Furthermore, human infections with *E. canis* have been reported in Venezuela and this pathogen might play a role as a zoonotic agent (Perez et al., 1996, 2006).

Recently, the genus *Ehrlichia* was reorganized on the basis of genetic studies and now, *E. platys* belongs the genus *Anaplasma* (Dumler et al., 2001). *Anaplasma platys* develops within canine platelets, but its pathogenic role in dogs is not clearly defined (Aguirre et al., 2006; Neer and Harrus, 2006). In the United States, most reports of

experimental and natural infections have indicated that *A. platys* causes no or few clinical signs in dogs (Neer and Harrus, 2006), however, in France, Spain and Turkey, *A. platys* strains seem to be more virulent (Beaufils et al., 2002; Aguirre et al., 2006; Ulutas et al., 2007).

These diseases are commonly diagnosed in tropical and subtropical regions of the world. In tropical countries like Brazil, *E. canis* seroprevalences of 19.8% and 21% have been reported in dogs (Dagnone et al. 2003; Labarte et al., 2003); and Ramos et al. (2009) found 57 and 55% of positive dogs by nested PCR (nPCR) analysis for *E. canis* and *A. platys* respectively. *E. canis* and *A. platys* infections are difficult to detect in vivo because the bacteremia is usually low (Santos et al. 2009a; Harrus and Waner, 2010). Serological testing is the most used method, but antibodies are usually not present during early stages of infection, and serodiagnostic assays do not distinguish between infection and prior exposure (Dong et al., 2008; Harrus and Waner, 2010). Moreover, serologic tests may cross-react, particularly among members of the same genus (Dong et al., 2008; Nakagui et al 2008). Serology has an important role in the subclinical and in the chronic phase whereas nested PCR is recommended in the acute stage and, especially, to identify the species (Dong et al., 2008; Nakagui et al., 2008).

Despite the worldwide distribution of *E. canis* and *A. platys*, there has been limited information available about prevalence and genetic diversity of *E.canis* and *A.platys* strains in Southern Brazil. Infection caused by *A. platys* in dogs has never been investigated in Porto Alegre, although *Rhiphicephalus sanguineus* ticks are common ectoparasites on dogs in this city (Ribeiro et al., 1997). We determined herein, the occurrence of *E. canis* and *A. platys* from naturally infected dogs in Porto Alegre/Brazil, using serology combined with nPCR followed by the characterization of the strain by partial sequence analysis of 16S

rRNA gene. In addition, we evaluated the risk factors of infection and the effects on hematological parameters in naturally infected dogs.

2. Materials and methods

2.1. Study population and data availability

The study was carried out in Porto Alegre, capital city of Rio Grande do Sul state, Brazil between May 2007 and February 2009. Porto Alegre is located at 30° 01' 59"S latitude, and 51° 13' 48"W longitude. The climate of the area is subtropical humid with a summer rainy season. Dog samples were obtained from Arquipelago Islands, and Control Center of Zoonosis (CCZ). The Arquipelago neighborhood is the biggest Porto Alegre neighborhood and has a population of proximally 5,000 inhabitants; most of them rely on garbage recycling. In the present study we investigated Ilha Grande dos Marinheiros and Ilha do Pavão, two of the most inhabited islands. CCZ is a shelter and control center of zoonotic diseases that rescues stray dogs from the urban area of Porto Alegre city. A total of 146 owned and 53 stray dogs were sampled. Samples were obtained in Ilha Grande dos Marinheiros (n=106 DNA samples and n=104 serum samples), Ilha do Pavão (n=40) and CCZ (n=53 DNA samples and n=52 serum samples) without specific inclusion criteria. Animals receiving antibiotic therapy at the time of evaluation were excluded from the study. Dogs were classified into different categories in order to assess possible risk factors such as gender, age, breed, lifestyle (indoors *versus* outdoors), street access and contact with other animals by a questionnaire in Arquipelago population. The current study did not include epidemiological aspects when considering shelter dogs, then, the variables analyzed (with the exception of gender) are not available in such dogs.

2.2 Blood collection and hematological analyses

Blood was collected into vacutainer tubes (BD[®], Franklin Lakes, NJ, USA) containing EDTA as anticoagulant for hematological analyses and PCR, and without anticoagulant for serological tests. Serum was collected and stored at -20°C until used. Samples for PCR analysis were kept frozen at -20°C until DNA extraction. Blood cell counts were determined as previously described (Pöpl et al., 2009).

2.3. Serology – ELISA based assay

Samples were tested for antibodies reactive against *E. canis* and *Anaplasma sp.* using a rapid, in-clinic ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Snap 4Dx Test kit (Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) according manufacturer's instructions. Although *A. phagocytophilum* antigens are used in this kit, *A. platys* antibodies cross-react with the *A. phagocytophilum* spot on the Snap 4Dx Test (Chandrashekar, et al., 2010).

2.4. DNA extraction

DNA was extracted and isolated from 200 µL of EDTA-blood using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Valencia, California, USA), following the manufacturer's instructions. Samples were stored at -20°C for later PCR testing. In order to minimize potential risks of contamination, DNA extractions, PCR preparation, PCR amplification, and agarose gel electrophoresis were performed in separate rooms.

2.5. Cloning and quality control

To verify the existence of amplifiable DNA in the samples, a PCR assay for the housekeeping gene glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was performed as previously described (Santos et al., 2009b). Positive controls were obtained from dogs naturally infected with *E. canis* and *A. platys* from Londrina (PR/Brazil). To construct reliable positive controls, nested PCR (nPCR) for *E. canis* and *A. platys* detection was

performed (described below). Amplicons were purified from gel (Zimoclean DNA Gel Recovery, Zimo Research, Orange, CA, USA), and cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) followed by transformation in JM 109 Competent Cells (Promega, Madison, WI, USA). Plasmids with inserts were isolated, grown and purified using a commercial kit (Miniprep, QIAGEN, Valencia, CA, USA). Controls were then re-tested by the nPCR. DNA concentration was quantified by scanning UV spectrophotometry (NanoDrop[®] ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE) to determine the number of copies/ μ L. The limit of detection for the nPCR was determined by using serial 10-fold dilutions of the plasmid positive controls spiked in Herring Sperm DNA (KPL, Gaithersburg, MD, USA) as DNA template.

2.6. Nested PCR

Samples were initially screened using the universal primer fD1 and a genus-specific primer EHR16SR (Inokuma et al., 2001). These primers amplify 760 bp of the partial sequence of the 16S rRNA gene of ehrlichial and anaplasma species. Briefly, five microliters of DNA was used as template for the primary amplification in a total reaction mixture of 25 μ l containing 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1.25U of *Taq* polymerase (Go *Taq* Flexi Promega, Madison, WI, USA) and 0.1 mM each of primers. After initial denaturation at 94°C for 1 min, amplification consisted of 35 cycles of 1 min each at temperatures of 94, 55, and 72°C for denaturation, annealing, and extension, respectively. The second amplification (nested PCR) was carried out using the primers CANIS and GA1UR for *E. canis* (409 bp), and PLATYS F and PLATYS R for *A. platys* (504 bp) with few modifications (Inokuma et al., 2001). The first PCR product was diluted 1:5 with nuclease free water and 1 μ L of the solution was used as the template DNA for the second reaction. Conditions for the PCR amplification were the same as for

the first PCR except for the annealing temperature for *E. canis* (57.6°C) and number of cycles (39). In each PCR run, a negative control consisted of all reagents excluding sample. Positive controls were dilutions of a plasmid containing 5.47×10^9 and 6.18×10^{10} copies/ μL of the 16S rRNA gene of *E. canis* and *A. platys* for all PCR reactions. The amplified PCR products were subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose for one hour at 100 V, followed by ethidium bromide staining (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and visualized under 312 nm UV light transilluminator. The gels were subsequently photographed using Epi Chem II Darkroom® (UVP, Inc., Upland, California, USA).

2.7. PCR for *VirB9* and *GroEL* genes

Conventional PCR assays for a fragment of *VirB9* and *GroEL* genes, specific for *A. platys* and *E. canis* infection, respectively, were also performed as previously described (Felek et al., 2003; Beall et al. 2008).

2.8. DNA sequencing

The PCR products were purified using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), and the amplicons were directly sequenced with both forward and reverse primers (Purdue Genomics Core Facility at Purdue University, West Lafayette, IN, USA). *Anaplasma platys* 16S rRNA sequence obtained in this study was compared to those of the GenBank database using BLASTn program in order to search for identity. A partial 16S rRNA gene sequence of 408bp was deposited in GenBank database as isolate Porto Alegre under the accession number JF418996.

2.9. Statistical Analysis

Different groups were compared with each other, for each parameter, using the Stata 11.1 Program (Stata Corp, College Atation, TX 77845, USA). Statistical Univariate analysis for association between seropositivity or infection and risk factors and

hematological parameters was conducted using Chi-square test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Dog population

Dog population from Arquipelago neighborhood consisted of 78 males and 68 females. Ages ranged from 1 to 16 years. Various breeds were represented (43/146, 29.46%) and 103 (70.54%) dogs were mixed breeding. All dogs from Arquipelago neighborhood ($n=146$) lived outdoors and 77/146 (52.73%) of them had street access. Shelter dog population consisted of 43 males and 10 females. Characteristics of each population are represented in table 1.

3.2. Molecular and Serological prevalence

We evaluated the serological and molecular prevalence of selected organisms in 199 dogs (199 DNA and 196 serum samples). The nPCR assays were able to amplify the control template diluted as much 10^1 and 10^3 gene copies per reaction for *E.canis* and *A. platys* respectively and all the samples were positive for GAPDH, confirming the presence of amplifiable DNA in the samples. *E. canis* infection or exposure was not detected in any dog blood sample by PCR for the 16S rRNA and *VirB9* genes or by detection of antibodies.

Infection and/or exposure were detected in 43 dog samples in the present study. Among 196 dog sera, 20 (10.2%) showed antibodies reactive to *Anaplasma phagocytophilum* by the Snap 4Dx Test. According the manufacturer, we considered these serologic reactions due to cross-reaction with *A. platys*. Thirteen seropositive dogs live at Arquipelago neighborhood (4 at Ilha do Pavão and 9 at Ilha Grande dos Marinheiros), and 7 were shelter dogs (CCZ).

A. platys DNA was amplified by 16S rRNA nPCR testing (Figure 1) in 27/199 (13.56%) dog samples. Twenty one dogs from Arquipelago neighborhood (2 at Ilha do Pavão and 19 at Ilha Grande dos Marinheiros) and 6 shelters dogs. A total of 6 dogs had *Anaplasma* sp. antibodies and were PCR positive; and 19 dogs were PCR positive but seronegatives. Serum was not available for three PCR positive dogs samples. Fourteen dogs were negative by nPCR but have antibodies reactive to *Anaplasma* sp. Among the 16S PCR positive dogs, fourteen were also positive by *GroEL* gene PCR. Negative samples by *GroEL* gene were sequenced confirming its identity. *E. canis* infection or exposure was not detected in any dog blood sample by PCR for the 16S rRNA and *VirB9* genes or by detection of antibodies. Serology and PCR results are summarized in table 2.

There was no positive association between PCR and ELISA results. Exposure was higher in CCZ dogs (13.46%) than Arquipelago neighborhood (9.02%), however with no statistical difference. Interestingly, the prevalence of infection (DNA detection) was higher at Arquipelago neighborhood (14.38%) than at CCZ shelter (11.32%), also with no difference by statistical analysis (Figure 2).

3.3. Hematologic parameters

Among the 27 *A. platys* infected dogs, 16 (59.25%) had anemia ($5.5 - 8.5 \times 10^6/\mu\text{L}$) and 13 (52%) had thrombocytopenia ($<200 \times 10^3/\mu\text{L}$). Two positive samples showed fibrin formation and platelets count could not be performed. There was no association between positive serology or PCR and other CBC alterations except basophiles count that was associated with positive PCR ($p=0.015$).

3.4. Risk Factors

No statistical association was found between breed, gender, age, life-style, street access, or contact with other animals and positive PCR or serology.

3.5. Sequencing and Molecular characterization

Sequence comparisons of a fragment of 408 bp of the isolates from Porto Alegre revealed that the amplicons had sequences identical (100%) between each other. Analysis of the 16S rRNA gene sequence revealed a high similarity with the sequences of different *A. platys* isolates. *Anaplasma platys* isolate Porto Alegre is identical to *A. platys* isolates in others Brazilian regions deposited in GenBank. In addition, sequences were identical to African (Cape Verde), European (Italy, Portugal and Spain) and Asian (Japan and Thailand) strains. The lowest similarity (99.75%) was with strain identified in dogs from Venezuela.

4. Discussion

Canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* and canine infectious cyclic thrombocytopenia caused by *Anaplasma platys* are of veterinary importance worldwide. In Southern Brazil little information is available about *E. canis* and *A. platys* and its epidemiology. We combined serologic and molecular diagnostic methods in two different canine populations from Porto Alegre: dogs from a public shelter (CCZ) and owned dogs from Arquipelago neighborhood. While positive PCR was interpreted as active infection, positive serology was taken to indicate exposure or subclinical/chronic infection.

All samples were negative for *E. canis* detection by PCR and by the Snap 4Dx test indicating a low occurrence of *E. canis* in Southern Brazil comparing to others regions. These results were somehow expected because the dogs herein were not selected based in clinical or laboratory signs of MCE, like most of the studies conducted in Brazil (Dagnone et al., 2003; Bulla et al., 2004; Macieira et al., 2005; Trapp et al., 2006). Studies in Southern states of Brazil showed a low occurrence of *E. canis* infection while using similar

populations: 1.7% and 4.8% of seropositive dogs in Rio Grande do Sul (Labarthe et al., 2003; Saito et al., 2008), 0.7% in Santa Catarina and 4.7% in Paraná state (Labarthe et al., 2003). On the other hand, southeastern, northeastern, and central regions of the country serology detection can range from 15–54.5% of dogs (Labarthe et al., 2003; Bulla et al., 2004, reviewed in Vieira et al., 2011; Costa Jr et al., 2007a). As we used peripheral blood samples, it could be postulated that the occurrence of false-negative results in nPCR for *E. canis* detection because the agent can be sequestered in the spleen and bone marrow during the subclinical or chronic phase (Mylonakis et al. 2003; Harrus et al. 2004). However, we did not find any seropositive (exposed) dog, which leads us to conclude that prevalence of *E. canis* in Porto Alegre is really low. The reasons for such contrasting differences are unknown, because the vector *R. sanguineus* is abundant through all urban areas of Brazil (Saito et al., 2008), including Rio Grande do Sul state (Ribeiro et al., 1997). Moreover, Arquipelago neighborhood population is predominantly poor, and their animals are usually infested with ticks. While these results suggest a geographic difference; climate, geography, and tick species were not evaluated

Positive ELISA-based serology and positive PCR for *A. platys* occurred in 22.2% (06/27) of the positive samples; 14 seroreactive dogs were negative by PCR testing. A similar study showed, on the other hand, that positive dogs by PCR were all negative by serology using the same ELISA-based commercial kit (Ferreira et al., 2008a), which means that negative serology does not mean absence of the organism. Probably, dogs that had concurrent antibodies and bacteremia were in an acute stage of infection, while seroreactive but PCR negative dogs were in a transient stage from acute to subclinical or chronic infection. Additionally, the cyclic parasitemia in dogs infected with *A. platys* might also explain the discrepancy between PCR and serology in some cases (Martin et al., 2005). Furthermore, we can hypothesize that infected dogs with *A. platys* do not usually

present clinical signs, and some seroreactive dogs are chronically infected or may have evolved towards cure while still having detectable amounts of antibodies.

PCR positive infected dogs but negative by serology were probably in an early stage of infection. In experimentally *A. platys* infected dogs, serum samples were tested with Snap 4Dx Test and antibodies to *Anaplasma* spp. were first detected just by day 16 post infection (PI). In the same study, dogs became PCR positive within three to five days and there was a progression to PCR negative blood by day 160 PI (Gaunt et al., 2010). Another possibility is that dogs were immunocompromised and could not produce enough detectable antibodies (Suksawat et al., 2001).

A. phagocytophilum analyte in the Snap 4Dx cross-react and detect exposure by *Anaplasma platys* (Snap 4Dx Test kit insert). Data from our work confirm the occurrence of cross-reactive between *A. phagocytophilum* and *A. platys*, since we were able to amplify *A. platys* DNA of seropositive dogs and its sequence confirmed the etiology as *A. platys*. On the other hand, we assumed that dogs that were positive by the Snap 4Dx Test but negative by PCR were *A. platys* since PCR assays for *A. phagocytophilum* were not performed. In our better knowledge, *A. phagocytophilum* has never been described in Brazil, probably due to lack of its main tick vectors, *Ixodes ricinus* and *I. scapularis*. In a surveillance for zoonotic vector-borne disease, 198 sick dogs with clinical signs of tick borne disease were analyzed and there was no evidence (serological or by PCR) of *A. phagocytophilum* exposure or infection (Diniz et al., 2007). Furthermore, two hundred horses suspected of babesiosis or anaplasmosis were negative by *A. phagocytophilum* by nPCR in Central West Brazil (Salvagni et al., 2010).

Canine anaplasmosis has been recognized sporadically in Brazil and just few cases have been formally published in the literature (Dantas-Torres, 2008). Frequency comparisons among different studies must be cautiously performed. Differences in animal

population characteristics as well as diagnostic techniques are likely to influence the results. Nevertheless, when using dogs suspected of having *A. platys* infection, Ramos et al. (2009), observed 55 nPCR-positive samples of 100 suspected dogs; Ferreira et al. (2007), found 15.84% positive samples by nPCR in dogs with platelets bodies inclusions; and Dagnone et al (2009) observed 25.49% (13/51) positive samples also by nPCR in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. Using a similar population than our studies, 8.1% positive dogs were observed in Ribeirão Preto (Santos et al., 2009a) and 11.69% in Minas Gerais (Costa Jr., 2007b) by nPCR. These results showed a slight lower frequency than our observations in Porto Alegre (13.56%), and it might be explained by the studied population herein, where all the dogs had street access or lived outdoor with consequently more exposure to ticks than others. So far, we can conclude that *A. platys* infection is common in dogs from Southern Brazil.

Clinical cases of canine infectious cyclic thrombocytopenia (CICT) have been reported throughout the world (Beaufils et al., 2002; Aguirre et al., 2006; Ulutas et al., 2007; Cardoso et al., 2010), but there have been little information about *A. platys* prevalence. *A. platys* DNA was detected in 32% of 200 stray dogs in Japan (Motoi et al., 2001), in 33% of the dogs in a kennel in USA (Kordick, et al., 1999) and in 16% of military training dogs in Venezuela (Huang et al., 2005). In Louisiana (USA) 50% of 86 dogs tested were IFA positive (Hoskins et al., 1988). Our results demonstrate that *A. platys* affects dogs in Porto Alegre as described in other Brazilian regions (Ferreira et al., 2007, 2008; Costa Jr., 2007b; Dagnone et al., 2009; Ramos et al., 2009), although molecular characterization involving a comparison of DNA sequences of Brazilian strains with strains around the world has been scarce (Cardozo et al., 2007).

The 16S rRNA gene of samples that were positive by nPCR for the presence of *Anaplasma platys* DNA was partially sequenced. To our knowledge, there is no genetic

information about *A. platys* in Rio Grande do Sul. Sequence comparisons of the isolate Porto Alegre revealed that the amplicons had sequences identical (100%) to those 16S rRNA gene sequences of *A. platys* from others Brazilian regions such Ribeirão Preto, Rio de Janeiro and Pernambuco, and others around the world. Interestingly, the *A. platys* sequence from Pernambuco isolated from a cat was 100% identical with the dog's isolates. Our results are in concordance with previous 16S RNA gene analysis reports. There is a slight genetic variation among 16S rRNA geographically diverse strains (Huang et al., 2005; Martin et al., 2005), despite the variety of polymorphisms described in different geographic regions (Inokuma et al., 2002).

Although 16S rRNA gene serves as a good target for pathogen detection (Heeb et al., 2003), inespecific bands was observed in the nPCR assay. For this reason we used additional PCR assay for *groEL* gene, specific for *A. platys* in order to confirm the 16S rDNA PCR positive samples. The sensitivity of the PCR for *groEL* gene was not assigned in this work, which might explain why only 14 out of 27 samples positive for *A. platys* were positive for *groEL*. For this reason we used DNA sequencing to confirm the identity of all the positive samples.

Although anemia and thrombocytopenia is a common finding associated with *A. platys* infection (Neer and Harrus, 2006; Ferreira et al., 2008b). our study did not reveal positive association between anemia or thrombocytopenia with bacteremia (PCR positive). However, several dogs (59.25% and 52%) had PCV/RBC and platelet counts below the reference range, respectively. It can be explained by possible co-infections or bad nutritional status, since most of these dogs are fed food scraps, garbage or low quality diet. These co-finding factors might have interfered with the statistical analyses.

Veterinarians tend to rely on thrombocytopenia to diagnose CME after clinical examination of tick infested animals, and in the absence of characteristic clinical sign of

other diseases, followed by antibiotic treatment with no identification of other possible cause (Santos et al., 2009a). This study shows that, in Porto Alegre, thrombocytopenia is more often associated with *A. platys* than *E. canis* infection, which actually has a very low prevalence.

Literature describes cases of *A. platys* infection presenting WBC count within (Aguirre et al., 2006) and over (Beaufils et al., 2002; Ulutas et al., 2007) reference ranges. In this study, WBC count in dogs naturally infected or exposed to *A. platys* was very variable and could not be used as markers of the disease. Although there was no other WBC significant difference between infected and non-infected dogs, basophiles count was associated with positive PCR ($p=0.015$). There are no studies reporting basophilia in *A. platys* infection, but basophils are known to respond chemotactically to bacterial products (Jain, 1993).

Little is known about risk factors associated with canine anaplasmosis in Brazil. We were not able to assign risk factors for the infection. Accordingly, no significant differences were reported in other studies when analyzing variables, such as gender, breed and age and presence and specie of ticks in previous studies (Costa Jr, 2007b; Dantas-Torres, 2008). Moreover, the majority of infected dogs in our study (i.e., >70%) were asymptomatic, and there was no association between seropositivity or infection and clinical abnormalities, which was expected, since *A. platys* infection is seldom associated with clinical disease (Dantas-Torres, 2008).

To our best knowledge, this is the first molecular and epidemiologic study to investigate vector borne pathogens in domestic dogs from Porto Alegre: our results indicate that CICT caused by *A. platys* is endemic. Regarding its high occurrence, veterinarians in Porto Alegre should consider *A. platys* infection in their diagnostic routine. Despite the fact that *A. platys* is considered to be of less pathogenic importance than other

species in the family *Anaplasmataceae* such as *E. canis*, the impact of *A. platys* on animal health should not be overlooked, since *A. platys* can be a potentializer to other diseases and can range from clinically inapparent to severe infection (Cardozo et al., 2009; Gaunt et al., 2010). These findings indicate the need for further studies regarding canine cyclic thrombocytopenia in Brazil, and the need for surveillance and further investigation of dogs as a potential reservoir of *A. platys*, *E. canis* and other blood parasites.

5. Conclusion

We report for the first time in Southern Brazil the natural infection of *A. platys* in dogs and molecular characterization of *A. platys* strains amplified from naturally infected dogs in Porto Alegre. Sequencing the 16S rRNA gene indicates no substantial genetic diversity between Porto Alegre isolate compared with other *A. platys* strains available in GenBank. This work reinforces previous studies that reported *A. platys* infecting dogs in Brazil and contribute to the genetic characterization of *A. platys*. Further studies including phylogenetic characterization of the agent, extent of these infections and tick vectors are necessary in order to better understand the epidemiology of CICT. Our results demonstrated the positive impact of PCR-based assays on the diagnosis of CICT. However, for an accurate diagnosis, the combination of serologic and molecular methods is recommended, since no risk factors and hematological abnormalities were associated with *A. platys* infection. Although dogs are commonly infected with *E. canis* in Brazil, all dogs tested were negative for *E. canis* infection/exposure in Porto Alegre. Thus, *E. canis* prevalence in Porto Alegre is very low or might be absent.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors thank Dr. Ahmed Mohamed for Statistical Analyses.

Camila Serina Lasta's stipend was supported also by Idexx Laboratories (Westbrook, ME, USA) as part of this study and Purdue University.

6. References

Aguirre, E., Tesouro, M.A., Ruiz, L., Amusatogui, I., Sainz, A., 2006. Genetic Characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in Dogs in Spain. *J. Vet. Med.* 53, 197–200.

Beall, M. J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P.V.P., Mainville, C., Hegarty, B.C., Crawford, J.C., Breitschwerdt, E.B., 2008. Serological and Molecular Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* Species in Dogs from Minnesota. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 8, 455-464. DOI: 10.1089/vbz.2007.0236

Beaufils, J.P., Inokuma, H., Martin-granel, J., Jumelle, P., Barbault-jumell, M., Brouqui, P., 2002. *Anaplasma platys (Ehrlichia platys)* infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. *Rev. Med. Vet.* 153, 85-90.

Bulla, C., Takahira, R.K., Araújo Jr., J.P., Trinca, L.A., Lopes, R.S., Wiedmeyer, C.E., 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet. Res.* 35, 141–146.

Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Mekuzas, Y.Y., Baneth, G., 2010. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *The Veterinary Journal.* 183, 232–233. doi:10.1016/j.tvjl.2008.10.009

Cardozo, G.P., Oliveira, L.P., Zissou, V.G., Donini, I.A.N., Roberto, P.G., Marins, M., 2007. Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38, 478-479.

Cardozo, G.P., Oliveira, L. P., Mansur, M. A. B., Santos, E. V., Roberto, P. G., Marins, M. 2009. Molecular characterization of two strains of *Anaplasma platys* in Brazil. **Veterinary Record**, 164, 338-339.

Chandrashekar, R., Mainville, C.A., Beall, M.J., O'Connor, T., Eberts, M.D., Alleman, R.A., Gaunt, S.D., Breitschwerdt, E.B., 2010. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 71, 1443-1450.

Costa Jr, L.M., Rembeck, K., Ribeiro, M.F.B., Beelitz, P., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2007a. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *The Veterinary Journal*. 174, 673–676 .

Costa Jr, L.M., 2007b. Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais: utilização de métodos de diagnóstico direto, indireto e molecular. Master Dissertation. Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, Belo Horizonte.

Dagnone, A.S., Morais, H.S.A., Vidotto, M.C., 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a Hospital population in South Brazil. *Vet.Parasitol*. 117, 285-290.

Dagnone, A.S., Souza, A.I., André, M.R., Machado, R.Z., 2009. Diagnóstico molecular de agentes da família Anaplasmataceae em cães com sinais clínicos e microscópios de erliquiose. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 20-25.

Dantas-Torres, F., 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*. 1:25. doi:10.1186/1756-3305-1-25.

Dong, J., Olano J.P., McBride, J.W., Walker, D.H., 2008. Emerging Pathogens: Challenges and Successes of Molecular Diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics*. 10, 185-197.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.

Ferreira, R.F., Cerqueira, A.M.F., Pereira, A.M., Guimarães, C.M., Sá, A.G., Abreu, F.S., Massard, C.L., Almosny, N.R.P., 2007. *Anaplasma platys* Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 5, 113-119.

Ferreira, R.F., Cerqueira, A.M.F., Pereira, A.M., Velho, P.B., Azevedo, R.R.M., Rodrigues I.L.F., Almosny, N.R.P., 2008a. Cross-reaction evaluation of PCR-*Anaplasma platys* positive dogs tested to *Anaplasma phagocytophilum* antibodies by commercial ELISA. *Brazil. J. Vet. Parasitol.* 17, 5-8.

Ferreira, R.F., Cerqueira, A.M.F., Pereira, A.M., Ferreira, M.S., Almosny, N.R.P., 2008b. Hematologic Parameters in Polymerase Chain Reaction-Positive and -Negative Dogs for *Anaplasma platys* Presenting Platelet Inclusion Bodies. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 6, 185-190.

Felek, S., Huang, H., Rikihisa, Y., 2003. Sequence and Expression Analysis of *virB9* of the Type IV Secretion System of *Ehrlichia canis* Strains in Ticks, Dogs, and Cultured Cells. *Infection And Immunity*, 71, 6063–6067. DOI: 10.1128/IAI.71.10.6063–6067.2003

Gaunt, S.D., Beall, M.J., Stillman, B.A., Lorentzen, L., Diniz, P.P.V.P., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E.B., 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*. 3.

Harrus, S. and Waner, T., 2010. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001.

Heeb, H.L., Wilkerson, M.J., Chun, R., Ganta, R.R., 2003. Large Granular Lymphocytosis, Lymphocyte Subset Inversion, Thrombocytopenia, Dysproteinemia, and Positive *Ehrlichia* Serology in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 39:379-384.

Huang, H., Unver, A., Perez, M.J., Orellana, N.G., Rikihisa, Y., 2005. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz. J. Microbiol.* 36, 211-216.

Hoskins, J.D., Breitschwerdt, E.B., Gaunt, S.D., French, T.W., Burgdorfer, W., 1988. Antibodies to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2, 55-59.

Inokuma, H., Ohno, K., Onishi, T., Raoult, D., Brouqui, P., 2001. Detection of Ehrlichial Infection by PCR from Yamagishi and Okinawa Prefectures, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 815-817.

Inokuma, H., Fujii, K., Okuda, M., Onishi, T., Beaufils, J., Raoult, D., Brouqui, P., 2002. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *groESL* and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9, 1132–1136.

Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., Mcpherson, J.T., Maccormack, J.N., 1999.

Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 2631–2638.

Labarthe, N., Pereira, M.C., Barbarini, O., Mckee, W., Coimbra, C.A., Hoskins, J., 2003. Serologic Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. *Veterinary Therapeutics*. 4, 67-75.

Macieira, D.B., Messick, J.B., Cerqueira Ade, M., Freire, I.M., Linhares, G.F., Almeida, N.K., Almosny, N.R., 2005. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Clin. Pathol*. 34, 44–48.

Martin A.R., Brown, G.K., Dunstan, R.H., Roberts, T.K., 2005. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Parasitol*. 109, 176-180.

Motoi, Y., Satoh, H., Inokuma, H., Kiyuuna, T., Muramatsu, Y., Ueno, H., Morita, C., 2001. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol*. 45, 89-91.

Nakaghi, A.C.H., Machado, R.Z., Costa, M.T.I., André, M.R., Baldani, C.D., 2008. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*. 38, 766-770.

Neer, T. M., Harrus, S., 2006. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: Greene, C. E. (Elsevier), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*.

Perez, M., Y. Rikihisa, Wen B., 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol*. 34, 2133–2139.

Perez, M., Bodor M., Zhang C., Xiong Q., Rikihisa Y., 2006. Human Infection with *Ehrlichia Canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 7, 1078 – 110.

Pöpl, A.G., Lasta, C.A., González, F.H.D., Kucharski, L.C. Silva, R.S.M., 2009. Insulin sensitivity indexes in female dogs: effect of estrus cycle and pyometra. *Acta Scientiae Veterinariae*. ISSN 1679-9216 (Online)

Ramos, C. A.N. , Ramos, R.A.N., Araújo, F.R., Guedes Jr, D.S., Souza, I.I.F., Ono, T.M., Vieira, A.S., Pimentel, D.S., Rosas, E.O., Faustino, M.A.G. , Alves, L.C. 2009. Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*. 18, 58-62.

Ribeiro, V.L.S., Weber, M.A., Fetzer, L.O., Vargas, C.R.B., 1997. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 27, 285-289.

Saito, T.B., Cunha-Filho, N.A., Pacheco, R.C., Ferreira, F., Pappen, F.G., Farias, N.A.R., Larsson, C.E., Labruna, M.B., 2008 Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 102–108.

Santos, F., Coppede, J.S., Pereira, A.L.A., Oliveira, L.P., Roberto, P.G., Benedetti, R.B.R., Zucoloto, L.B., Sobreira, L., Marins, M., 2009a. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *The Veterinary Journal*. 179, 145–148.

Santos, A.P., Messick, J.B., Biondo, A.W., Oliveira, S.T., Pedralli, V., Lasta, C.S., Lacerda, L.A., Esteves, V.S., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., Gonzalez, F.H.D., 2009b. Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 16S rDNA in domestic cats from Brazil. *Vet Clin Pathol*. DOI:10.1111/j.1939-165X.2009.00158.x.

Suksawat, J., Pitulle, C., Arraga-Alvarado, C., Madrigal, K., Hancock, S.I., Breitschwerdt, E.B., 2001. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand

and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. J. Clin. Microbiol. 39, 90-93.

Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., Morais, H.S., 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. Veterinary Parasitology. 140, 223–230.

Ulutas, B., Bayramli, G., Karagenc, T., 2007. First Case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* Infection in a Dog in Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31, 279-282.

Vieira, R.F.C., Biondo, A.W., Guimarães, A.M.S., Santos, A.P., Santos, R.P., Dutra, L.H., Diniz, P.P.V.P., Morais, H.A., Messick, J.B., Labruna, M.B., Vidotto, O., 2011. Ehrlichiosis in Brazil. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal. 20, 1-12.

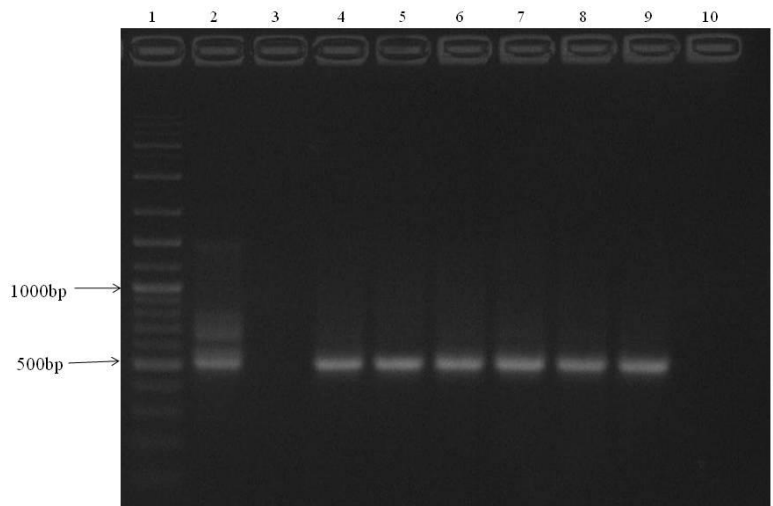


Figure 1. PCR results for *Anaplasma platys* detection in dog samples from Porto Alegre, Brazil. Lane 1, molecular weight marker (100bp, Invitrogen Corp.); Lane 2, *A. platys* positive control; Lanes 3 and 10, negative controls (ultrapure water); Lane 4 to 9, positive samples.

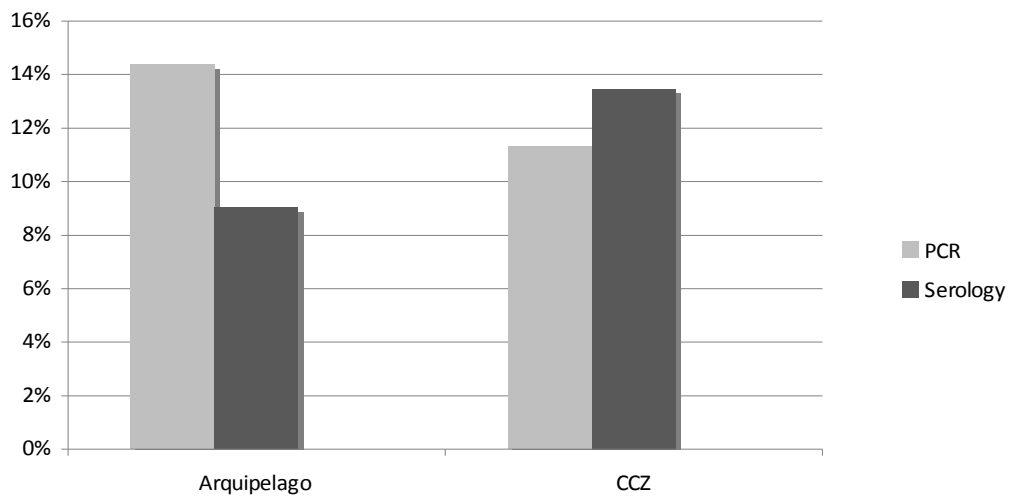


Figure 2. Frequency of positive dogs for *A. platys* in two analyzed populations according the diagnostic methods.

Table 1. Characteristics of the two populations analyzed in this study.

Characteristics	Population	
	Arquipelago	CCZ
Group	Arquipelago	CCZ
Questionnaire	Yes	No
Source	Pet Owned	Shelter dogs
Age	1-16 years	Adult dogs (> 1 year)
Gender	78 male	43 male
	68 female	10 female
Total	146	53

Table 2. Results obtained by nPCR and Snap 4Dx Test in dogs naturally exposed /infected.

Organisms	PCR +		Serology +	
	N	%	N	%
<i>Ehrlichia canis</i>	0	0	0	0
<i>Anaplasma platys</i>	27	13.56	20	10.2
Negative results	172	86.44	176	89.8
Total	199	100	196	100

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de estudos prévios (Braccini et al., 1992; Seibert et al., 1997) atestarem a ocorrência de *Ehrlichia canis* em Porto Alegre, a presença deste agente não pôde ser comprovada no presente estudo. Considerando que neste trabalho foram utilizadas amostras de sangue periférico, poderia ser especulada a ocorrência de resultados falso-negativos na nPCR para detecção de *E. canis* pois em animais infectados o agente pode ser sequestrado no baço e medula óssea durante as fases subclínica a crônica (Mylonakis et al., 2003; Harrus et al., 2004). Entretanto, não foi observado nenhum cão sororreagente (exposto) no presente estudo, o que nos leva a conclusão de que a prevalência de *E. canis* em Porto Alegre realmente é baixa. Esta conclusão serve de alerta aos clínicos veterinários que aqui atuam e se faz importante visto que, na prática clínica comumente os cães recebem o diagnóstico de EMC apenas com base na presença de carrapatos e trombocitopenia. Esta posição deve ser repensada por parte dos veterinários, que devem buscar o diagnóstico definitivo através de técnicas adequadas.

A grande diferença entre nossos resultados e outros trabalhos pode ser devido, em parte, ao fato de que a maioria dos trabalhos publicados a respeito da prevalência de *E. canis* no Brasil se refere a populações de cães trombocitopênicos (Dagnone et al., 2003; Macieira et al., 2005; Dagnone et al., 2009), o que pode superestimar a real prevalência do agente no país. Além disso, muitos destes estudos utilizam apenas técnicas sorológicas e, como já exposto anteriormente, um resultado positivo em teste sorológico não indica necessariamente infecção ativa, mas sim exposição ao agente. Por outro lado, estudos prévios no Rio Grande do Sul corroboram a baixa ocorrência de *E. canis* no estado (Labarthe et al., 2003; Saito et al., 2008), e desta maneira concluímos que provavelmente o agente está presente, mas sua ocorrência é extremamente baixa. Loretti & Barros (2004),

questionam a relevância da EMC no Rio Grande do Sul, pois apesar de a doença ser comumente diagnosticada na prática clínica, *E. canis* dificilmente é observada durante necropsias, no diagnóstico citológico ou histopatológico nos principais laboratórios de diagnóstico de patologia veterinária do estado (UFPeL, Pelotas, UFRGS, Porto Alegre e UFSM, Santa Maria). Os resultados aqui apresentados são similares àqueles descritos no Japão (Inokuma et al., 2001, 2003), onde foi relatada a presença de *A. platys* em cães e carrapatos através de técnicas moleculares, enquanto DNA de *E. canis* não foi amplificado em nenhuma das amostras analisadas.

A escolha de analisar animais residentes nas duas principais Ilhas do Bairro Arquipélago se deu devido ao fato de que as vilas populares de Porto Alegre são os locais mais atingidos pela infestação do principal vetor de ambos agentes (Ribeiro et al., 1997). O Bairro Arquipélago é composto por 16 ilhas fluviais (Figura 3), constituídas pelos sedimentos dos rios Jacuí, dos Sinos, Caí e Gravataí, que desembocam no Lago Guaíba e está localizado em uma área de preservação ambiental de 17.245 hectares, que compõe o Parque Estadual do Delta do Jacuí. A população do Bairro Arquipélago sobrevive em condições de extrema pobreza, sendo a principal fonte de renda da população a venda de material reciclável recolhido no município. As moradias não têm infra-estrutura (Figura 4), não há saneamento básico nem retirada do lixo acumulado (Gomes & Soller, 2007). A presença de lixo e entulhos favorece a proliferação de roedores, que podem ser hospedeiros dos estágios imaturos do carrapato *R. sanguineus*, enquanto carnívoros e ungulados são os principais hospedeiros do estágio adulto (Ribeiro et al., 1997). Além disso, este tipo de instalação favorece o desenvolvimento do carrapato *R. sanguineus*, que busca abrigo em frestas e buracos (Ribeiro et al., 1997; Labruna & Pereira, 2001), comuns nas residências deste bairro.

O objetivo da utilização de cães mantidos no Centro de Controle de Zoonoses foi abranger animais de diferentes bairros da cidade, visto que o CCZ recolhe cães de todo município e cães de rua são considerados mais expostos à infestação por endo e ectoparasitas, e conseqüentemente à infecção por doenças transmitidas por carrapatos. A escolha de duas populações altamente suscetíveis à infestação por carrapatos poderia superestimar a prevalência dos agentes estudados, entretanto, surpreendentemente, a prevalência de *E. canis* mostrou-se nula; enquanto a prevalência de *A. platys* foi similar a outros estudos em diferentes regiões brasileiras.

Os resultados obtidos no presente estudo comprovaram a presença do agente *Anaplasma platys* em cães no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Para tal, fizemos uso de técnicas sorológicas e moleculares. No diagnóstico sorológico utilizamos o teste rápido Snap 4DX (Idexx Lab) e foi possível confirmar a ocorrência de reação cruzada entre *A. phagocytophilum* e *A. platys*, de acordo com a indicação do fabricante. Apesar de que, até o momento, não existe evidência da presença do agente *A. phagocytophilum* no Brasil, realizamos o sequenciamento das amostras positivas na PCR e deste modo pudemos confirmar a identidade do agente. Não foi observada associação positiva entre os resultados sorológicos e moleculares, o que pode ser explicado pelo comportamento cíclico do agente na circulação, além de diferentes fases da infecção. Sendo assim, o Snap 4Dx Test pode ser usado na prática clínica como um teste confiável no diagnóstico de *A. platys*, desde que as limitações do teste sejam levadas em consideração. Além da qualidade do teste, o Snap 4Dx é um teste rápido e de fácil realização, que dispensa aparelhos ou mão de obra especializada, permitindo avaliar grande número de amostras de maneira padronizada (Bélanger et al., 2002; Harrus et al., 2002; Chandrashekar et al., 2010).

A presença de *A. platys* infectando cães em Porto Alegre era esperada, pois o principal vetor envolvido na transmissão do agente está presente neste município e existem relatos orais da presença do agente detectado através da pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. A maioria dos cães infectados (PCR positiva) apresentava trombocitopenia, entretanto, não foi observada associação significativa entre alterações hematológicas e infecção ou exposição, indicando que *A. platys* presente em Porto Alegre é realmente pouco patogênica.

Investigações adicionais se fazem necessárias a fim de esclarecer o padrão filogenético do agente *Anaplasma platys* presente em Porto Alegre através do sequenciamento de regiões menos conservadas e construção de uma árvore filogenética. Sugere-se também, a investigação da ocorrência de *E. canis* em cães suspeitos a fim de esclarecer a ocorrência do agente no município.



Figura 3. Vista aérea do Bairro Arquipélago, município de Porto Alegre.



Figura 4. Aspecto das moradias e presença de entulhos, demonstrando a precária condição de vida dos moradores do Bairro Arquipélago.

6 REFERÊNCIAS

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

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p.126-132, 2007.

AGUIRRE, E.; TESOURO, MA.; RUIZ, L.; AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A. Genetic Characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in Dogs in Spain. **J. Vet. Med. B**, v.53, p.197–200, 2006.

ALMOSNY, N.R.P & MASSARD, C.L. Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. 135 p. Rio de Janeiro, 2002.

AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M.A.; KAKOMA, I.; SAINZ, A. Serological Reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in Dogs from Northwestern Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.6, 2008.

ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAST, P. Fine structural characterisation of a Rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis **J. Med. Microbiol**, v 48, p. 991-997, 1999. ISSN 0022-261.

BAKER, D.C.; GAUNT, S.D.; BABIN, S.S. Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. **Am. J. Vet. Res**, v.49, n.7, p.1014-1016, 1988.

BANETH, G., WANER, T., KOPLAH, A., WEINSTEIN, S., KEYSARY, A., Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Vet. Rec.**, v.38, p.257–259, 1996.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321–325, 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.022

BEAUFILS, J.P.; INOKUMA, H.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.; BARBAULT-JUMELL, M.; BROUQUI, P. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. **Rev Med Vet**, v.153, p. 85-90, 2002.

BELANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3506–3508, 2002.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.

BOWMAN, D.; LITTLE, S.E.; LORENTZEN, L.; SHIELDS, J. SULLIVAN, M.P.; CARLIN, E.P. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.138–148, 2009.

BRACCINI, G.L.; CHAPLIN, E.L.; STOBBE, N.S.; ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, N.R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de

Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos 1986 a 1990. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, n.20, p.134-149, 1992.

BRADFIELD, J.F.; VORE, S.J.; PRYOR JR, W.H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. **Laboratory Animal Sciences**, v. 46, n. 5, p. 565-567, 1996.

BRANDÃO, L.P.; HASEGAWA, M.Y.; HAGIWARA, M.K.; KOHAYAGAWA, A. Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n.1, p. 78 -81, 2006.

BROWN, G.K.; MARTIN, A.R.; ROBERTS, T.K.; AITKEN, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Aust Vet J**, v. 79,n.8, 554-558, 2001.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO Jr., J.P.; TRINCA, LA; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res**, v.35, p.141–146, 2004.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.M.; BACELLAR, F. ROCHA, C.M.B.M.; MAFRA C.L.; LEITE R.C.; WALKER, D.H. Human ehrlichiosis in Brazil: first suspected cases. **Braz J Infect Dis**, v.8, p.259-62, 2004.

CARDOSO, L.; TUNA, J.; VIEIRA, L.; MEKUZAS, Y.Y.; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **The Veterinary Journal**, v.183, p.232–233, 2010.

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

CHANDRASHEKAR, R., MAINVILLE, C.A., BEALL, M.J., O'CONNOR, T., EBERTS, M.D., ALLEMAN, R.A., GAUNT, S.D., BREITSCHWERDT, E.B. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma*

phagocytophilum, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.71, p.1443-1450, 2010.

CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v.186, p.166-169, 1985.

CODNER, E.C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G.K.; SMITH, C.A.; ROBERTSON, J.L.; MARTIN, R.A.; TROY G.C. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am. J. Vet. Res**, v.53, p.2286–2291, 1992.

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

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C. JOJOMA, F.S.; VODOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a Hospital population in South Brazil. **Vet.Parasitol**, v.117, p.285-290, 2003.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v.18, n.4, p. 20-25, 2009.

DINIZ, P.P.V.P.; SCHWARTZ, D.S.; DE MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonot Dis**, v.7, p.689–698, 2007.

DINIZ, P.P.V.P.; BEALL, M.J.; KOMARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.A.; CYR, K.E.; KOTERSKI, J.F.; ROBBINS, R.J.; LALO, P.G.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. High Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Dogs from an

Indian Reservation in Northeastern Arizona. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2009.

DOI: 10.1089=vbz.2008.0184

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.51, p.2145-2165, 2001.

DUNCAN, A.W.; CORREA, M.T.; LEVINE, J.F.; BREITSCHWERDT, E.B. The dog as a sentinel for human infection: prevalence of *Borrelia burgdorferi* C6 antibodies in dogs from southeastern and mid-Atlantic states. **Vector Borne Zoonot Dis**, v.5, n.2, p.101 – 109, 2005.

EDDLESTONE, S.M.; GAUNT, S.D.; NEER, T.M.; BOUDREAUX, C.M.; GILL, A.; HASCHKE, A.; CORSTVET, R.E. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 205–210, 2007.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution on the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 453–470, 2000.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. **Intern J Appl Res Vet Med**, v.5, n.3, 2007.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; FERREIRA, M.S.; ALMOSNY, N.R.P. Hematologic Parameters in Polymerase Chain Reaction-Positive and -Negative Dogs for *Anaplasma platys* Presenting Platelet Inclusion Bodies. **Intern J Appl Res Vet Med**, v.6, n.3, 2008.

FRANK, J.R. & BREITSCHWERDT, E.B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med**, v.13, p.194–201, 1999.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, v.175, p.212–217, 2008.

GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. **Am. J. Vet. Res**, n.51, v.2, p.290-293, 1990.

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

GOMES & SOLLER. Navegando nos ambientes da Ilha Grande dos Marinheiros: Turismo responsável e geração de renda, 2007. Disponível em: http://www.coodestur.com.br/Conteudos_HTML/Destaques/destaques_artigo_05.pdf.

Acesso em 24/05/2009.

HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet Rec**, v.139, p.290–293, 1996a.

HARRUS, S.; WARIER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v.66, p.241-249, 1996b.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet Records**, v.141, p.247-250, 1997a.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997b.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T.E. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. **The Compendium Continuing Education**, v.19, n4. p. 431-444, 1997c.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J.E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **J Clin Microbiol**, v.36, n.1, p.73-76, 1998a.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH I.; HILLARY V.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. 15–27, 1998b.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, S.M.; WANER T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Vet Microbiol**, v.86, p.361-368, 2002.

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

HARRUS, S.; PERLMAN-AVRAHAMI A.; MUMCUOGLU, K.Y.; MORICK, D.; EYAL O.; BANETH G. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, 2010. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03316.x

HARRUS, S. & WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, 2010. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. **J Infect Di**, v.137, p. 182-188, 1978.

HESS, P.R.; ENGLISH, R.V.; HEGARTY, B.C.; BROWN, G.D.; BREITSCHWERDT, E.B. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p.117–125, 2006.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J.; ORELLANA N.G.; YASUKO RIKIHISA. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 211-216, 2005.

ISMAIL, N.; CROSSLEY, E.C.; STEVENSON, H.L.; WALKER, D.H. Relative Importance of T-Cell Subsets in Monocytotropic Ehrlichiosis: a Novel Effector Mechanism Involved in *Ehrlichia*-Induced Immunopathology in Murine Ehrlichiosis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4608–4620, 2007. doi:10.1128/IAI.00198-07

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

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol**, v.38, p.4219–4221, 2000.

INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **J. Vet. Med. Sci**, v.63, p.815–817, 2001

INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusion in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Vet. Parasitol**, v.110, p.145–152, 2002.

INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.343–348, 2003.

JOHNSON, E. M.; EWING S.A.; BARKER, R.W.; FOX, J.C.; CROW, D.W; KOCAN, K. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol**, v.74, p. 277–288, 1998.

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

KAVINSKI, L.C. Ocorrência de um caso ehrlichiose canina em Curitiba-PR. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.10, p.217-219, 1988.

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

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

LABRUNA, M. B & PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 30, p. 24 – 32, 2001.

LORETTI, A.P. & BARROS, S.S. Parasitismo por *Rangelia Vitalli* em cães ("nambiuú", "peste de sangue") - uma revisão crítica sobre o assunto. **Arq. Inst. Biol.**, v.71, n.1, p.101-131, 2004.

MACHADO, R.Z. Erliquiose Canina. **Rev Bras Parasitol Vet**, n.13 (supl.1), p. 53-57, 2004.

McDADE, J.E. Ehrlichiosis – A Disease of Animals and Humans. **Journal Infectious Disease**, v.161, p.609-617, 1990.

MARTIN, A.R.; BROWN, G.K.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Exp Parasitol**, v.109, n.3, p. 176-180, 2005.

MENESES, I.D.S.; SOUZA, B.M.S.; TEIXEIRA, C.M.M.; GUIMARÃES, J.E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. Na**, v.9, n.4, p. 770-776, 2008.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.2, 2003. doi: 10.1590/S0102-09352003000200003

MOREIRA SM; MACHADO R; PASSOS LF. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v35, n.4, p.958-960, 2005.

MOTOI, Y.; SATOH, H.; INOKUMA, H.; KIYUUNA, T.; MURAMATSU, Y.; UENO, H.; MORITA C. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. **Microbiol. Immunol**, v.45, n.1, p.89-91, 2001.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. 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, 2003.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; BILINIS, C.D.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.40, p. 174-184, 2004.

MYLONAKIS, M.E.; KRITSEPI-KONSTANTINOY, M.; DUMLER, J.S.; DINIZ, P.P.V. P.; DAY, M.J.; SIARKOU, V.I.; BREITSCHWERDT, E.B.; PSYCHAS, V.; PETANIDES T.; KOUTINAS, A.F. Severe Hepatitis Associated with Acute *Ehrlichia canis* Infection in a Dog. **Vet Intern Med**, v.24, p.633–638, 2010.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.I.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, p.766-770, 2008.

NEER, T. M. & HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 203-230.

PADDOCK, C.D. & CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.1, p.37-64, 2003.

PANTCHEV, N.; SCHAPER, R.; LIMOUSIN, S.; NORDEN, N.; WEISE, M.; LORENTZEN, L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. **Parasitol Res**, 2009. DOI 10.1007/s00436-009-1501-2

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol**, v.34, p.2133–2139, 1996.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA Y. Human Infection with *Ehrlichia Canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. **Ann. N.Y. Acad. Science**, v.1078, p. 110–117, 2006.

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

Ehrlichia canis e *Anaplasma platys* em cães. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v. 18, supl. 1, p. 58-62, 2009.

RIKIHISA, Y. The Tribe Ehrlichiae and Ehrlichial Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4; p.286-308, 1991.

ROQUEPLO, C.; CHEMINEL, V.; BOURRY, O.; GOMEZ, J.; PREVOSTO, J.; PARZY, D.; DAVOUST, B. Canine ehrlichiosis in the Ivory Coast and Gabon: alteration of biochemical blood parameters based on *Ehrlichia canis* serology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, Supplement 2, 2009.

SAITO, T.B.; CUNHA-FILHO, N.A.; PACHECO, R.C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A.R.; LARSSON, C.E.; LABRUNA, M.B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.79, n.1, p. 102–108, 2008.

SANOGO, Y.O.; DAVOUST, B.; INOKUMA, H.; CAMICAS, J.L.; PAROLA, P.; BROUQUI P. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. **Onderstepoort J Vet Res**, v.70, p.205–212, 2003.

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

SEIBERT, M. Ocorrência de *Ehrlichia* (Rickettsiales:Rickettsiaceae) em cães conduzidos ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.25, p.84-94, 1997.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUSHI, K.; JINBO T. Monitoring C Reactive Protein in Beagle Dogs Experimentally Inoculated with *E. canis*. **Veterinary Research Communications**, v.26, p.171-177, 2007.

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

SMITH, R.D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, L.; BAYLOR, R.A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infect. Immun**, v.11, p.1216–1221, 1975.

STICH, R.W.; SCHAEFER, J.J.; BREMER, W.G.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, 256–273, 2008.

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

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KARAMAN, M.; OZEN H. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Journal Compilation - 2009 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, Suppl. 2, p.59–61, 2009. DOI 10.1111/j.1469-0691.2008.02634.x

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

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs

with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p.1–15, 2001.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Clin Microbiol**, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997.

WINSLOW, G. M.; YAGER, E.; SHILO, K.; VOLK, E.; REILLY, A.; CHU, F.K. Antibody-Mediated Elimination of the Obligate Intracellular Bacterial Pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during Active Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n.4, p. 2187–2195, 2000.

WINSLOW, G.M.; YAGER, E.; LI, J.S. Mechanisms of humoral immunity during *Ehrlichia chaffeensis* infection. **Ann N Y Acad Sci**, v. 90, p. 435 – 443.

WOODY, B.J & HOSKINS, J.D. EHRLICHIAL diseases of dogs. **Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.** 21: 75-98, 1991.

VINASCO J; LI O; ALVARADO A; DIAZ D; HOYOS L; TABACHI L; SIRIGIREDDY K; FERGUSON C; MORO MH. Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2716–2719, 2007. doi:10.1128/JCM.01102-07.

YAGER, E.; BITSAKTSIS, C.; NANDI, B.; MCBRIDE, J.W.; WINSLOW, G. Essential Role for Humoral Immunity during *Ehrlichia* Infection in Immunocompetent Mice. **Infection and Immunity**, v.73, n.12, p. 8009–8016, 2005. doi:10.1128/IAI.73.12.8009–8016.2005

YU, X.J.; MCBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.337–346, 2007.

YU, D.H.; LI, Y.H.; YOON, J.S.; LEE, J.H.; LEE, M.J.; YU, I.J.; CHAE, J.S.; PARK, J.H.

Ehrlichia chaffeensis Infection in Dogs in South Korea. **Vector-Borne and Zoonotic**

Diseases, v.8, n.3, p. 355-358, 2008. doi:10.1089/vbz.2007.0226.