

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TESE

**MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E METAGENÔMICO
DE AGENTES ANAPLASMATACEAE EM FELINOS DOMÉSTICOS
(DOMICILIADOS E ERRANTES) E GAMBÁS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO.**

Andresa Guimarães

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E METAGENÔMICO
DE AGENTES ANAPLASMATACEAE EM FELINOS DOMÉSTICOS
(DOMICILIADOS E ERRANTES) E GAMBÁS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

ANDRESA GUIMARÃES

Sob orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

e Co-orientação do Professor
John Stephen Dumler

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária
(Patologia e Ciências Clínicas)

Seropédica, RJ
Junho de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G963 m Guimaraes, Andresa , 1989-
Métodos de Diagnóstico Molecular e Metagenômico de
Agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos
(domiciliados e errantes) e gambás da Região
Metropolitana do Rio de Janeiro / Andresa Guimaraes.
- 2017.
62 f.

Orientadora: Cristiane Divan Baldani.
Coorientador: John Stephen Dumler.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, 2017.

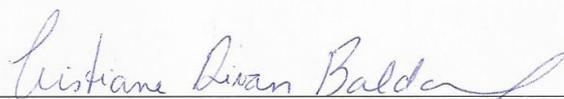
1. Patologia Animal. I. Divan Baldani, Cristiane,
1978-, orient. II. Dumler, John Stephen, 1955-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

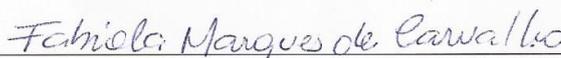
ANDRESA GUIMARÃES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

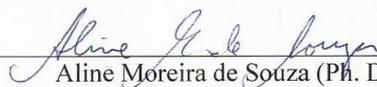
TESE APROVADA EM 04/07/2017



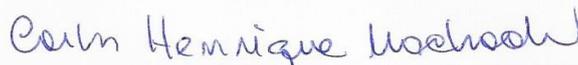
Cristiane Divan Baldani (Ph. D) UFRRJ
(orientador)



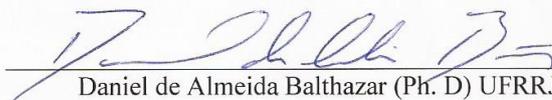
Fabíola Marques de Carvalho (Ph. D) LNCC



Aline Moreira de Souza (Ph. D) UFF



Carlos Henrique Machado (Ph. D) UFRRJ



Daniel de Almeida Balthazar (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

À Deus, por guiar meus passos e me iluminar até aqui.

Ao meu pai, grande homem, por ensinar caráter e bondade. Saudades eternas.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ronaldo Guimarães e Deise Luci de Araújo Guimarães, pelo apoio, amor e incentivo sempre.

À minha irmã Andréa Guimarães, minha melhor amiga, por toda ajuda neste trabalho e na minha vida, amo você.

À minha vózinha Zenith Barbosa de Araujo, que além de todo apoio, sempre tinha uma palavra de conforto e um colo a oferecer.

Ao meu irmão Anderson Guimarães por acreditar e torcer por mim.

Ao meu marido Agnaldo Machado de Andrade, pela ajuda no presente trabalho e pelo carinho e paciência dedicados a mim por todos esses anos.

Aos meus padrinhos e familiares pela torcida e carinho.

À Pandora e a todos os animais, razão da minha profissão.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, pelo exemplo de profissional e pessoa, por ser muito mais que apenas orientadora, sempre disposta a ajudar e pelo aprendizado nestes anos de convivência.

Ao meu orientador no doutorado sanduíche Prof. Dr. Steve Dumler, pela oportunidade na University of Maryland, pelos ensinamentos e pela agradável estadia durante os 10 meses que estive nos EUA.

As minhas companheiras e amigas de laboratório Juliana Macedo Raimundo, Aline Tonussi da Silva, Camila Flávia Magalhães Botelho, Gleice Marques Amaro, Ágatha Ferreira Xavier de Oliveira, pela ajuda em diversas etapas deste trabalho e pelo apoio e amizade de sempre.

Às queridas companheiras de laboratório na University of Maryland, Emily Clems, Valeria Pappas-Brown e Ijiuru pela calma com meu “bad English”, ensinamentos valiosos e amizade que levarei para toda a vida.

Ao querido professor Dennis Grab, por permitir que eu participasse dos experimentos na Johns Hopkins Medical School e por ser um grande amigo.

À Dr.^a Fabíola Marques e funcionários do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), pela indispensável ajuda nas análises dos dados de Metagenômica e pela disposição e paciência demonstrados pela Fabíola em ensinar uma principiante na área.

Aos amigos de profissão, Caio Balduino Rodrigues, Maria Lopes Correa e Raisa Brault Rodrigues pela imensa ajuda nas coletas dos abrigos, cheias de emoção.

Aos Professores Dr. Marcos Rogério André e Dr.^a Rosângela Zacarias Machado e seus alunos (em especial Márcia e Keyla), pela acolhida em Jaboticabal, pelos ensinamentos, principalmente em biologia molecular, e por toda a contribuição essencial para realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Machado, pelos ensinamentos, colaboração e disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard e Prof. Dr. Huarrisson Azevedo dos Santos e aos amigos que frequentam o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (W.O. Neitz) do Departamento de Parasitologia Animal, Maristela Peckle Peixoto, Claudia Bezerra Silva, Renata Lins, Gabriela Vivas Vitari pela compreensão e auxílio na execução do presente estudo.

Ao amigo Marcus Sandes Pires, por estar sempre disposto a ajudar e pelas aulas de bioestatística. Vou ser sempre grata pela sua ajuda.

Ao amigo de profissão Carlos Roberto Mendes Kling, pela oportunidade, confiança e pelo aprendizado fornecidos.

À amiga veterinária Julianna Azevedo e as funcionárias do Laboratório Horse Center pela oportunidade oferecida e ensinamentos passados, além da companhia sempre alegre.

Às amigas Bruna Freire, Jenifer Souza, Tatiane Meira, Alessandra Araujo e Michelle Amarante pelos bons momentos, conselhos e amizade sincera que me deram forças para essa conquista.

As amigas Ana Claudia Tavares Miranda e Gabrielli Stefaninni Santiago pelo apoio, torcida e grande auxílio desde a graduação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela qualidade de ensino e por proporcionar aprendizados e amigos que levarei por toda minha vida.

Ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária e aos seus professores, pela oportunidade e pelos ensinamentos oferecidos.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro deste projeto.

À University of Maryland, Baltimore-MD, por permitir o período sanduíche na instituição e por financiar as análises de Metagenômica.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDRESA GUIMARÃES, filha de Ronaldo Guimarães e Deise Luci de Araujo Guimarães, nasceu em 21 de dezembro de 1989, no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Petrópolis e ensino médio no Centro Educacional Maurício Barroso.

Trabalhou como estagiária no ensino de Português e Matemática no Método de Ensino Kumon de 2003 a 2007.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 2007, no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação fez estágio nas áreas de Reprodução de equinos, com o prof. Julio Ferraz Jacob, Estágio na área de Clínica e Cirurgia de grandes animais, realizado no Hospital Veterinário de Grandes Animais, além de estágio com pequenos animais na Clínica Veterinária Kling.

Foi bolsista de Iniciação Científica de 2008 a 2012, sendo de 2008 a 2010, bolsista balcão do CNPq, sob orientação do prof. Dr. Fernando Queiroz de Almeida, desenvolvendo pesquisas na área de Experimentação em Nutrição de Equinos Atletas, com o tema: Avaliação de diferentes metodologias para estimativa da digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos em equinos; de 2010 a 2011, bolsista PIBIC, sob orientação do prof. Dr. Carlos Luiz Massard, desenvolvendo a pesquisa: Aspectos hematológicos e soroepidemiológicos da anaplasmoze caprina e ovina na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro; e de 2011 a 2012, bolsista PROIC, sob orientação da prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, desenvolvendo a pesquisa: Investigação sorológica de *Ehrlichia canis* em felinos domésticos do Rio de Janeiro.

Concluiu a graduação em Medicina Veterinária em março de 2012, período em que ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), nível Mestrado, Patologia e Ciências Clínicas, também na UFRRJ, sob orientação da prof.^a Dr.^a Cristiane Divan Baldani, sendo aprovada em primeiro lugar na classificação geral, desenvolvendo o tema: Diagnóstico sorológico e molecular dos agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos do Rio de Janeiro, com bolsa da CAPES.

Em 2013, foi aprovada no processo seletivo para mudança de nível de mestrado para doutorado pela CAPES. Obtendo grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) e ingressando no curso de doutorado pela mesma instituição.

Participou do Doutorado Sanduíche na University of Maryland, Baltimore-MD, de Março à Dezembro de 2015 sob orientação do Dr. John Stephen Dumler.

Participou de diversos estudos envolvendo diagnóstico de hemoparasitoses e patologia clínica aplicada em animais domésticos.

RESUMO

GUIMARÃES, Andresa. **Métodos De Diagnóstico Molecular E Metagenômico De Agentes Anaplasmataceae Em Felinos Domésticos (Domiciliados E Errantes) E Gambás Da Região Metropolitana Do Rio De Janeiro.** 2017. 62p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Os agentes Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas que são encontradas em leucócitos, plaquetas ou eritrócitos, formando mórulas, características de sua infecção. A transmissão desses agentes para o homem e animais ocorre principalmente por vetores artrópodes. A participação dos felinos domésticos e dos reservatórios silvestres ainda não são definidos, havendo poucos estudos sobre as hemoparasitoses que acometem estes animais. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de infecção pelos agentes da família Anaplasmataceae em felinos domésticos e gambás (*Didelphis* sp) do estado do Rio de Janeiro, por meio de métodos moleculares. Buscou-se sequenciar as amostras positivas na PCR para validação das mesmas e compará-las com aquelas depositadas no Genbank, assim como desenvolver novos métodos de diagnóstico visando resultados rápidos e de alto rendimento, como o “deep sequencing”, usado em ensaios de metagenômica. Também objetivou-se determinar quais alterações hematológicas (hemograma, alterações morfológicas celulares e inclusões de hemoparasitas) são mais frequentes e quais fatores associados estão relacionados a estas em duas populações de gatos distintas da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Foram estudadas duas populações de gatos domésticos, gatos errantes (n=105) e gatos domiciliados (n=178) da região Metropolitana do Rio de Janeiro. Também foram estudados 37 gambás recolhidos da natureza para reabilitação, estes foram testados para os mesmos agentes que os gatos. O diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* e *Anaplasma* spp. foi realizado por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Na comparação entre as duas populações de gatos, houve diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$), revelando que a população de errantes apresentava valores hematológicos fora do padrão para a espécie, sendo trombocitopenia, eosinofilia e hiperproteinemia os achados mais relevantes, em contrapartida a população de gatos domiciliados apresentou-se, em média, dentro dos parâmetros de referência para a espécie. Apenas um animal (0.56%) da população de gatos domiciliados foi positivo para *Ehrlichia chaffeensis* baseado no gene 16S rRNA, os demais felinos foram negativos para todos os agentes estudados. Apenas um gambá (2.7%) foi positivo na PCR para *E. canis* e *E. chaffeensis* simultaneamente, após sequenciamento demonstrou 100% de identidade com *E. canis*. Parte das populações de gatos foi submetida ao diagnóstico por “deep sequencing”, onde foi observado que os gêneros de bactérias patogênicas presentes com maior frequência nestas populações são: *Mycoplasma* e *Bartonella*, também foram identificadas diversas bactérias presentes na microbiota de felinos domésticos. Pode-se concluir que condições ambientais e de manejo interferem nos parâmetros hematológicos dos gatos domésticos, por isso a diferença entre domiciliados e errantes. Este é o primeiro relato de *E. chaffeensis* na população de gatos domésticos do Rio de Janeiro. Uma nova cepa de *E. canis* circula na população de gambás peridomiciliados do Rio de Janeiro. Sequenciamento de nova geração e estudos metagenômicos são formas de diagnóstico e ferramentas de estudo da microbiota dos animais domésticos e devem ser mais difundidos na Medicina Veterinária.

Palavras-chave: gatos, hemoparasitoses, diagnóstico.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Andresa. **Molecular and Metagenomic Diagnostic Methods of Anaplasmataceae Agents in Domestic Felids (Domiciled and Errant) and Opossums of Metropolitan Region of Rio de Janeiro.** 2017. 62p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Anaplasmataceae agents are gram-negative bacteria that are found in leukocytes, platelets or erythrocytes, forming morulae, characteristic of their infection. The transmission of these agents to man and animals occurs mainly by arthropod vectors. The participation of domestic felines and wild reservoirs has not yet been defined, with few studies on hemoparasitosis affecting these animals. The present study had as objective to investigate the presence of infection by Anaplasmataceae family agents in domestic felines and possums (*Didelphis* sp.) of the state of Rio de Janeiro, using molecular methods. We sought to sequence the PCR positive samples for validation of the same and to compare them with those deposited in Genbank, as well as to develop new diagnostic methods aiming at fast and high yield results, such as "deep sequencing", used in metagenomic assays. The aim of this study was to determine which hematological changes (hemogram, hematological morphology and hemoparasite inclusions) are more frequent and which associated factors are related to these in two distinct cat populations in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro. Two populations of domestic cats, wandering cats (n = 105) and domiciled cats (n = 178) from the Metropolitan region of Rio de Janeiro were studied. Also, were studied 37 opossums collected from nature for rehabilitation, these were tested for the same agents as cats. The diagnosis of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *Anaplasma* spp. was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR). In the comparison between the two populations of cats, there were significant differences between them (p <0.05), revealing that the wandering population had non-standard haematological values for the species, being thrombocytopenia, eosinophilia and hyperproteinemia the most relevant findings. In contrast, the population of domiciled cats presented, on average, within the reference parameters for the species. Only one animal (0.56%) of the domiciled cats population was positive for *Ehrlichia chaffeensis* based on the 16S rRNA gene, the other cats were negative for all the agents studied. Only one opossum (2.7%) was positive in the PCR for *E. canis* and *E. chaffeensis* simultaneously, after sequencing demonstrated 100% identity with *E. canis*. Part of the populations of cats was submitted to the diagnosis by deep sequencing, where it was observed that the genera of pathogenic bacteria present in these populations are: *Mycoplasma* and *Bartonella*, several bacteria were also present in the domestic feline microbiota. It can be concluded that environmental and management conditions interfere in the hematological parameters of domestic cats, so the difference between domiciled and errant. This is the first report of *E. chaffeensis* in the domestic cat population of Rio de Janeiro. A new strain of *E. canis* circulates in peridomicile opossum population of Rio de Janeiro. New generation sequencing and metagenomic studies are diagnostic forms and tools for studying the microbiota of domestic animals and should be more widespread in Veterinary Medicine.

Key words: cats, hemoparasitosis, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Dendrograma contendo amostras de gatos domésticos oriundos de abrigos (a) e domiciliados (b) divididas em 8 grupos utilizando um programa de divisão em clusters (rwasf hierarchical clustering - WESSA).	17
Capítulo 3	
Figure 1. Phylogenetic position of <i>Ehrlichia</i> sp. isolated from a Brazilian opossum based on 16S rRNA DNA sequences (300 bp). The tree was constructed using the neighbor-joining method, and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points. Accession numbers are indicated.	53
Capítulo 4	
Figura 1. Pontuação de qualidade de todas as bases (sequenciamento Sanger/Illumina) em relação à posição no read (pares de base).	56
Figura 2. Conteúdo de sequência em todas as bases (porcentagem de bases A, C, T e G) em relação à posição no read (pares de base).	57
Figura 3. Relação entre os principais reads com classificação Taxonômica e as amostras de Gatos domésticos. k:reino, p:filo, c:classe, o:ordem, f:família e g:gênero.	58
Figura 4. Identificação dos grupos microbianos contidos nos metagenomas de gatos domésticos do Rio de Janeiro identificados através do algoritmo de classificação taxonômica LCA (Lowest Common Ancestor) do MEGAN (HUSON et al., 2011), com os parâmetros de escore mínimo de alinhamento = 100, e-value superior a 10 ⁻⁵ , identidade mínima de 60%, mínimo suporte de 5 "hits", porcentagem LCA = 80.	59

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR e nested PCR, utilizadas para detecção molecular de <i>Ehrlichia</i> sp., <i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> e <i>Anaplasma</i> spp. baseadas no gene 16S <i>rRNA</i> .	14
Tabela 2. Descrição das sequências térmicas e de tempo para as reações de PCR e nested PCR para detecção de <i>Ehrlichia</i> sp., <i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> e <i>Anaplasma</i> spp. baseadas no gene 16S <i>rRNA</i> .	15
Capítulo 1	
Tabela 1. Distribuição dos animais de abrigos e domiciliados entre os municípios do estado do Rio de Janeiro.	34
Tabela 2. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, leucograma, trombograma e proteína plasmática total de duas populações de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.	36
Tabela 3. Principais achados hematológicos nas duas populações de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro.	37
Tabela 4. Fatores associados (sexo, raça, idade e castração) de gatos domésticos de duas populações da região metropolitana do Rio de Janeiro.	38
Capítulo 3	
Table 1. Description of primers, PCR product size and references used in PCR assays for <i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> and <i>Anaplasma</i> spp. based on 16S <i>rRNA</i> gene.	49

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

A	Base purina Adenina
BAS	Número de basófilos
C	Base pirimidina Citosina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DNA	cido desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfato desoxirribonucleotídeos
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EOS	Número de eosinófilos
FIB	Fibrinognio
G	Base purina Guanina
HB	Concentração de hemoglobina plasmática
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEM	Número de hemácias
LEUC	Número de leucócitos
LINF	Número de linfócitos
MON	Número de monócitos
Nested-PCR	Nested Reação em Cadeia pela Polimerase
NEUT	Número de neutrófilos
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLAQ	Plaquetas
PPT	Proteína plasmática total
qPCR	PCR em tempo real
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	cido Ribonucleico Ribossmico
T	Base pirimidina Timina
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Família Anaplasmataceae.....	2
2.2 Vetores.....	2
2.3 Reservatórios silvestres.....	3
2.4 Histórico da infecção por agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos.....	3
2.5 Patogenia, achados clínicos e laboratoriais.....	5
2.6 Importância em saúde pública.....	7
2.7 Diagnóstico	8
2.7.1 Detecção direta por esfregaço sanguíneo.....	8
2.7.2 Isolamento em cultura de células.....	8
2.7.3 Testes sorológicos.....	9
2.7.4 Detecção molecular.....	10
2.8 Tratamento e profilaxia.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Coleta de Sangue.....	13
3.3 Análise Hematológica.....	13
3.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	14
3.4.1 Extração de DNA de sangue total.....	14
3.4.2 Reações de amplificação (nested-PCR) para Ehrlichia sp. e Anaplasma spp. baseadas no gene 16S rRNA.....	14
3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	15
3.5 Sequenciamento de Nucleotídeos e Caracterização Molecular dos Isolados.....	15
3.6 Cuidados para evitar contaminações.....	16
3.7 Análise Estatística.....	16
3.8 Análises de Metagenômica.....	17
Referências Bibliográficas.....	20
Capítulo 1- Avaliação do perfil hematológico de duas populações de gatos (abrigos e domiciliados) do estado do Rio de Janeiro.....	33

1.Introdução.....	33
2. Material e Métodos....	34
3. Resultados.....	35
4. Discussão.....	38
5. Referência Bibliográfica.....	39
Capítulo 2- First detection of <i>Ehrlichia chaffeensis</i> in a cat from Rio de Janeiro, Brazil.....	42
1. Introduction.....	42
2. Material and Methods.....	42
3. Results.....	43
4. Discussion.....	44
5. References.....	45
Capítulo 3- A novel <i>Ehrlichia</i> sp. genotype in opossums (<i>Didelphis aurita</i>) in Brazil.....	47
1.Introduction.....	47
2. Material and methods	47
3. Results.....	49
4. Discussion.....	49
5. References.....	50
Capítulo 4- Metagenômica como diagnóstico de doenças causadas por bactérias e levantamento de microbiota em gatos domésticos.....	54
1. Introdução.....	54
2. Material e Métodos.....	55
3. Resultados	57
4. Discussão.....	60
5. Referência Bibliográfica.....	61

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores artrópodes representam novos desafios para a medicina humana e veterinária. Estas, por sua vez, estão ampliando sua distribuição geográfica, devido principalmente a mudanças climáticas e acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais. Um grande número de agentes infecciosos, hospedeiros e vetores estão envolvidos com estas enfermidades e sua epidemiologia.

A participação dos felinos domésticos e dos reservatórios silvestres ainda não são definidos, havendo poucos estudos sobre as hemoparasitoses que acometem estes animais. Acrescenta-se a isso, que no Brasil a população de gatos domésticos cresce a cada ano em função das facilidades de manejo, podendo esses animais servirem de reservatórios para vários agentes patogênicos ao homem.

Pequenos mamíferos selvagens com hábitos sinantrópicos, como gambás, raposas e pequenos roedores, também têm papel relevante como hospedeiros silvestres de diversas doenças. Se aproximam dos domicílios pela facilidade em conseguir comida e com isso carregam patógenos e ectoparasitos que passam a afetar animais domésticos e o homem.

Dentre os hemoparasitos que acometem felinos, os agentes da Família Anaplasmataceae, já foram relatados parasitando felinos domésticos e selvagens. Tratam-se de bactérias gram-negativas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias que ao adentrarem em leucócitos ou plaquetas formam inclusões características, denominadas de mórulas.

Os agentes Anaplasmataceae tem ampla distribuição territorial, havendo relato de infecção em diversos países e em diferentes espécies de vertebrados. Porém estudos envolvendo a infecção em felinos domésticos ainda são recentes, principalmente no Brasil, havendo apenas relatos esporádicos. Em geral, os gatos acometidos são assintomáticos, constituindo-se num risco maior por não serem identificados como portadores.

A erliquiose e a anaplasmose felinas são transmitidas por vetores. Porém ainda não se sabe ao certo quais os vetores no Brasil e as vias de transmissão da infecção natural, sendo provável que a exposição à artrópodes e a ingestão de roedores sejam as principais causas de infecção dos felinos. Vale ressaltar que a distribuição geográfica dos vetores tem influência direta sobre a prevalência da doença em uma determinada área.

Para diagnóstico de hemoparasitos em gatos normalmente se associa a clínica do animal, achados hematológicos sugestivos e pesquisa direta por microscopia óptica em esfregaço sanguíneo. Testes sorológicos também são empregados, mas estes detectam anticorpos, podendo haver resultados falso-negativos ou falso-positivos devido à reatividade cruzada. Testes moleculares estão disponíveis, mas ainda não são utilizados com grande frequência na clínica veterinária. Recentemente, os ensaios de metagenômica passaram a ser utilizados para fins de diagnóstico na medicina humana e se torna uma excelente ferramenta para a medicina veterinária.

O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de infecção pelos agentes da família Anaplasmataceae em duas populações de felinos domésticos (domiciliados e errantes) e gambás (*Didelphis* sp.) do estado do Rio de Janeiro, por meio de métodos moleculares. Objetivou-se caracterizar as alterações hematológicas mais significativas nas duas populações de felinos. Além disso, buscou-se desenvolver novos métodos de diagnóstico visando resultados rápidos e de alto rendimento, como o sequenciamento de nova geração, usado em ensaios de metagenômica, ampliando sua utilização na Medicina Veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Anaplasmataceae

As espécies pertencentes à família Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas, imóveis, intracelulares obrigatórias, cocóides a elipsoidais, residentes em fagossomos que causam doença no homem e animais. São organismos que se mantem na natureza através de interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (DUMLER et al., 2001; PADDOCK; CHILDS, 2003). Caracterizam-se por espécies filogeneticamente relacionadas, porém genética e antígenicamente diferentes (YU et al., 2006).

Em 2001, Dumler et al. reorganizaram os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*, como pertencentes à família Anaplasmataceae e à ordem Rickettsiales. Com isso, algumas espécies foram agrupadas em gêneros diferentes ao que pertenciam anteriormente. Essas mudanças foram baseadas em estudos moleculares que permitiram uma caracterização taxonômica mais precisa desses agentes. *Ehrlichia platys* e *E. bovis* passaram a ser denominadas de *A. platys* e *A. bovis*; as espécies *E. phagocytophila*, *E. equi* e o agente da Erliquiose Granulocítica Humana foram renomeados como espécie *A. phagocytophilum*, porém permaneceram como três cepas distintas. *Cowdria ruminantium* passou a ser *E. ruminantium*; e, *E. risticii* e *E. sennetsu* passaram a pertencer ao gênero *Neorickettsia* como *N. risticii* e *N. sennetsu* respectivamente.

Depois dessa reorganização, o gênero *Anaplasma* passou a conter as espécies *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*. O gênero *Ehrlichia* passou a ser composto por *E. ruminantium*, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris* e *E. ewingii*. Já o gênero *Neorickettsia* passou a conter as espécies *N. helminthoeca*, *N. risticii* e *N. sennetsu*, sendo que apenas *W. pipientis* permaneceu no gênero *Wolbachia*.

2.2 Vetores

Agentes Anaplasmataceae são transmitidas por vetores, com destaque para os carrapatos. Porém, ainda não se sabe ao certo quais os vetores responsáveis pela difusão em felinos no Brasil e as vias de transmissão da infecção natural, sendo provável que a exposição a artrópodes e a ingestão de roedores sejam as principais causas de infecção dos felinos (BEAUFILS et al., 1999; LAPPIN, 2001). Vale ressaltar que a distribuição geográfica dos vetores tem influência direta sobre a prevalência da doença em uma determinada área.

Os carrapatos são os maiores responsáveis pelas infecções por esses agentes. *Rhipicephalus sanguineus* é frequentemente associado à transmissão de *E. canis*, *A. platys* e *E. ewingii* (COHN, 2003). O gênero *Ixodes* spp. é responsável pela transmissão de *A. phagocytophilum* e os carrapatos *Amblyomma* spp. e *Dermacentor* spp. são transmissores de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (PREZIOSI; COHN, 2002).

Também é possível que em determinadas regiões alguns carrapatos que não os vetores sabidamente conhecidos, possam transmitir o hemoparasita, como exemplo a possível transmissão de *Anaplasma phagocytophilum* pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (SANTOS et al., 2011) ou transmissão de *E. canis* experimentalmente pelo carrapato *Dermacentor* sp. (JOHNSON et al., 1998). Por isso, são necessários novos estudos abrangendo diferentes regiões e seus carrapatos mais frequentes para pesquisar sua capacidade vetorial.

Uma única espécie de carrapato pode albergar mais de um agente, visto que um animal infectado pode estar infestado por carrapatos de mais de uma espécie e diferentes instares.

Assim, é possível co-infecção, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento no animal doente (BREITSCHWERDT et al., 1998).

2.3 Reservatórios silvestres

Investigações de reservatórios silvestres para agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos, tais como agentes Anaplasmataceae, ganharam grande importância nos últimos anos (MACHADO et al., 2006; FILONI et al., 2006; ANDRÉ et al., 2010; WIDMER et al., 2011; FILONI et al., 2012; ANDRÉ et al., 2012). A presença de animais domésticos em ambientes selvagens rendeu um aumento da translocação de agentes patogênicos transmitidos dos reservatórios animais selvagens através de vetores artrópodes para os seres humanos e animais de estimação (SHAW et al., 2001). Assim, a caracterização e variedade dos reservatórios infectados é uma importante meta de saúde pública em todo o mundo.

Gambás, capivaras e pequenos roedores são os hospedeiros mais prováveis para *R. rickettsii* (LABRUNA, 2009). Anticorpos do grupo febre maculosa podem ser detectados em gambás e roedores em áreas não endêmicas (PACHECO et al., 2007) e endêmicas (PENA et al., 2009) para febre maculosa brasileira (FMB). Várias espécies de *Babesia* spp. são relatadas em gambás da América do Sul (família Didelphidae) (DA SERRA FREIRE, 1979, HERRERA & URDANETA-MORALES, 1991). Gambás são comumente parasitados por carrapatos ixodídeos (LINARDI, 2006) e podem ser hospedeiros de diferentes hemoparasitas, incluindo agentes Anaplasmataceae.

2.4 Histórico da infecção por agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos

O primeiro relato de erliquiose felina ocorreu na França por Charpentier e Groulade (1986) que observaram mórulas em células mononucleares de gatos. Na América Latina, o primeiro relato ocorreu no Brasil, em 1998, no Estado do Rio de Janeiro em um gato febril, com sintomas inespecíficos e mórulas em plaquetas observadas na microscopia (ALMOSNY et al., 1998). Já a primeira detecção molecular de *E. canis* em gatos na América Latina também foi no Brasil, em animais atendidos na rotina laboratorial do hospital veterinário da Universidade Federal de Viçosa, conforme relatado por Oliveira et al. (2009).

A ocorrência de erliquiose felina no mundo varia bastante de acordo com a região estudada e a técnica de diagnóstico empregada. Na Espanha, dentre 235 gatos avaliados, 17,4% de gatos errantes e 18,4% dos gatos domiciliados foram positivos em teste sorológico (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI) para *Ehrlichia* sp. (ORTUÑO et al., 2005). Por outro lado, em Barcelona, Tabar et al. (2008) encontraram apenas um animal positivo pela PCR para os gêneros *Ehrlichia/Anaplasma* em 100 felinos estudados. Já na América do Norte não há evidências sorológicas da detecção deste agente, exceto em casos isolados de animais doentes (LITTLE, 2010).

No Brasil, existem poucos estudos investigando *Ehrlichia* em felinos. André e colaboradores (2008) observaram DNA de *E. canis* em 11 felinos selvagens de zoológicos de São Paulo e Brasília. Correa e colaboradores (2011) não encontraram o DNA de *Ehrlichia* em gatos do estado do Rio de Janeiro, mas encontrou *Anaplasma platys* (13,18% positivos). Em 2012, os anticorpos anti-*Ehrlichia* e detecção molecular no sangue de *Ehrlichia* spp. foram observadas em gatos do Maranhão (BRAGA et al., 2012), e em 2013, em gatos de Mato Grosso (BRAGA et al., 2013). Recentemente, foi comprovada, por método sorológico, a exposição de gatos a *E. canis* na região semiárida do nordeste brasileiro (FONTALVO et al., 2016).

Ehrlichia chaffeensis foi relatada em apenas um gato em São Luis, MA (BRAGA et al., 2012), sendo um agente pouco estudado e sem rota de transmissão definidos no nosso país.

O primeiro relato de inclusões sugestivas de *A. platys* em gatos no Brasil foi observado por Santarém et al. (2005) em uma gata atendida no Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP, no Brasil. O DNA de *Anaplasma platys* foi detectada em gatos de Pernambuco junto com a caracterização molecular do agente por Lima et al. (2010) em um felino doméstico com anorexia, apatia, anúria e constipação, onde observaram-se mórulas em plaquetas durante a hematoscopia. Em 2009, Dahroug detectou pela nested-PCR o DNA de *A. platys* em uma onça parda de cativeiro ao pesquisar felinos selvagens no Mato Grosso. Ainda no Brasil, Correa et al. (2011) observaram 13,18% (12/91) dos gatos positivos utilizando a nested-PCR, demonstrando a susceptibilidade de felinos ao agente e que há necessidade de maiores estudos envolvendo esta rickettsia.

Anaplasma phagocitophilum inicialmente foi identificado como agente da Erliquiose Granulocítica Humana, atualmente Anaplasmose Granulocítica Humana (AGH), sendo denominado *Ehrlichia equi* em cavalos e *Anaplasma phagocitophilum* em ovelhas e outros ruminantes (FOGGIE, 1949; RISTIC; HUXSOLL, 1984; MADEWELL; GRIBBLE, 1982); porém estudos moleculares demonstraram ser o mesmo organismo (DUMLER et al., 2001). O primeiro relato da infecção de *A. phagocitophilum* em cães foi realizado em 1982 na Califórnia (MADEWELL; GRIBBLE, 1982) e desde então a anaplasmose granulocítica tem sido identificada em várias espécies animais em diversas partes do mundo.

Na Suécia, Bjoersdorff e colaboradores (1999) descreveram o primeiro relato de erliquiose granulocítica felina por *A. phagocytophilum* confirmado pela PCR e pelo sequenciamento. A ocorrência em gatos domésticos nos Estados Unidos e em países da Europa é reportada (HEIKKILA et al., 2010; LAPPIN et al., 2004; TARELLO, 2005). Nos Estados Unidos, em regiões endêmicas, a soroprevalência chega a 30% (LITTLE, 2010). Na Flórida, dentre 553 gatos errantes, nove foram positivos para *A. phagocytophilum* pela PCR (LURIA et al., 2004). Em estudo conduzido por Billeter et al. (2007) avaliando gatos domésticos utilizando a RIFI, foi observado que o agente circula nos seguintes estados dos Estados Unidos: Flórida (12/90), Califórnia (3/23), Michigan (3/45) e Rhode Island (2/31); porém não houve detecção no Alabama (n=175) e Wisconsin (n=96) e também não houve animais positivos quando testados pela técnica de PCR. Já na Espanha, Solano-Gallego et al. (2006) observaram 1,8% de soropositividade utilizando a RIFI dentre os 168 animais estudados, porém estes animais foram negativos quando testados pela técnica de PCR. Recentemente, houve detecção molecular de *Anaplasma phagocytophilum* em 0,9% (2/222) gatos de abrigo na Coreia (Seung-Hun et al., 2016). Savidge e colaboradores (2016) relatam mórulas de *A. phagocytophilum* em neutrófilos de gatos naturalmente infectados na América do Norte em áreas endêmicas para o carrapato *Ixodes* sp., estes gatos tiveram infecção confirmada por PCR e apresentavam letargia, anorexia e febre.

A primeira detecção molecular de *A. phagocytophilum* ocorreu em cães do município de Seropédica, RJ, demonstrando a real possibilidade da circulação deste agente zoonótico nesta área (SANTOS et al., 2011). Machado et al. (2012) detectaram *A. phagocytophilum* em aves selvagens no Brasil, sugerindo que estas podem carrear agentes Anaplasmataceae servindo como fonte de infecção a outros animais no Brasil.

No Brasil, houve detecção molecular de organismo similar à *A. phagocytophilum* em três gatos (8/37) que circulavam em um Zoológico de São Paulo (André et al., 2014).

Vale ressaltar que Guimarães e colaboradores (2013) observaram detecção molecular e sorológica de *Ehrlichia* spp. e detecção molecular de *A. platys* em felinos domésticos do Rio de Janeiro.

2.5 Patogenia, achados clínicos e laboratoriais

A erliquiose é amplamente estudada em cães por causar uma doença grave, a erliquiose monocítica canina, relacionada a um quadro de anemia, leucopenia e trombocitopenia (HUXSOLL et al., 1969; HUXSOLL et al., 1970; HARRUS et al., 1999).

Na erliquiose canina, a transmissão do agente ocorre quando o carrapato infectado inocula sua secreção salivar contaminada no local da picada ao se alimentar de cães (GROVES et al., 1975). No hospedeiro vertebrado, a infecção inicia-se nos corpos elementares que penetram nos monócitos e linfócitos, multiplicando-se posteriormente por divisão binária formando os corpos iniciais, que após 7 a 12 dias de incubação darão origem as mórulas. As mórulas são as únicas formas identificadas microscopicamente nos hospedeiros vertebrados (McDADE, 1990), reconhecidas por inclusões de aspecto compacto, formadas por agrupados de pequenas estruturas que variam de forma cocóide a elipsoidal (RISTIC; HUXSOLL, 1984). A ruptura das células hospedeiras libera formas infectantes que dão continuidade exponencial ao processo ao atingir novas células. Uma ou mais mórulas podem estar infectando a mesma célula hospedeira (MARCONDES, 2009).

Na erliquiose felina, foram observadas alterações hematológicas como anemia, trombocitopenia, linfopenia e monocitose em gatos positivos pela PCR. Dentre essas, a anemia foi associada em gatos com títulos de anticorpos IgG entre 40 e 640, sendo cinco destes positivos pela técnica de PCR. Adicionalmente, gatos positivos na PCR apresentaram uma tendência a serem linfopênicos. Não foram observadas associações entre a presença de infecção nos gatos e suas respectivas idades e sexo (BRAGA et al., 2013). Os sinais clínicos e determinações laboratoriais de felídeos infectados por *E. canis* são variáveis e compreendem febre, apatia, anorexia, palidez de mucosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, aumento da atividade sérica das transaminases, fosfatase alcalina e hiperglobulinemia (ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY; MASSARD, 1999; STUBBS et al., 2000). Almosny e Massard (2002) observaram sinais de caquexia, emaciação, diarreia e distúrbio congestivo hemorrágico notável nos pulmões como achados anátomo-patológicos em felinos jovens inoculados experimentalmente com *E. canis*.

Em estudos com cães, foi observado que animais tratados no estágio agudo da doença, onde há presença da sintomatologia exacerbada, respondem bem ao tratamento, porém a eliminação do agente pode ser difícil e o animal torna-se cronicamente infectado, servindo de reservatório. O período de incubação da erliquiose em cães é de aproximadamente uma a três semanas (HARRUS et al., 1997b), após esse período, a doença evolui para os estágios agudo, subclínico e, em certos casos, crônico (HARRUS et al., 1997a). *Ehrlichia canis* possui predileção por células encontradas na microvascularização dos pulmões, rins e meninges (HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997a, b), sendo a epistaxis causada por hemorragias características dos pulmões ou da mucosa nasal (RIKIHISA, 1991).

Na infecção por *Ehrlichia* sp. ocorre diversas recombinações nos genes das suas principais proteínas antigênicas, formando vários epítomos antigênicos distintos, que permitem a esses agentes escapar das defesas do organismo e manter infecções persistentes (REDDY; STRECK, 1999).

O vetor da erliquiose canina é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, porém foi provado experimentalmente que o carrapato *Dermacentor* sp. também pode transmitir *E. canis* (JOHNSON et al., 1998). A transmissão do cão para o carrapato ocorre principalmente durante as duas a três primeiras semanas pós-infecção. Isto acontece porque na fase aguda da doença há um número maior de leucócitos contaminados na circulação (WOODY e HOSKINS, 1991).

Os vetores infectados podem transmitir a doença por ao menos 155 dias após a infecção (NEER; HARRUS, 2006).

Na infecção por *A. platys* o período de incubação varia de oito a 15 dias. Na fase aguda da doença é possível observar grande quantidade de plaquetas infectadas no sangue. Com a multiplicação intensa do agente, após alguns dias, há queda brusca na contagem de plaquetas, atingindo valores de 20.000 plaquetas/ μ L ou menos, tornando-se pequena a chance de observação do parasita. Após o desaparecimento dos microrganismos, a plaquetometria volta ao normal em três ou quatro dias. De sete a 14 dias após o primeiro episódio, ocorre outra parasitemia seguida por trombocitopenia. Estes episódios ocorrem de forma cíclica e tendem a diminuir com o passar do tempo, levando à fase crônica da doença onde há aparições esporádicas do parasita e trombocitopenias moderadas (HIBLER et al., 1986; HARVEY, 1990; SWANGO et al., 1989; WOODY; HOSKINS, 1991).

Os animais infectados com *A. platys* são na maioria assintomáticos. As manifestações clínicas de cães experimentalmente infectados variam, sendo mais frequentemente observadas depressão, anorexia, letargia, emaciação, linfadenomegalia, palidez de mucosas e febre (HARRUS et al., 1997a). Os principais achados laboratoriais da infecção por *A. platys* são trombocitopenia, anemia (DAGNONE et al., 2003), macroplaquetas, monocitose e hipoalbuminemia (HARRUS et al., 1997a, KAKOMA et al., 2000). A severa trombocitopenia causada pelo agente se deve a diminuição da sobrevivência das plaquetas como consequência da multiplicação intensa deste organismo. No caso da cronicidade da doença, a remoção das plaquetas pode ocorrer por uma resposta imunomediada (STILES, 2000; WOODY; HOSKINS, 1991); outra hipótese que causa uma pseudotrombocitopenia devido a agregação plaquetária (GAUNT et al., 1990) e anisocitose plaquetária (THRALL et al., 2015). Em gatos, os sintomas associados ainda não foram bem elucidados.

Anaplasma phagocytophilum, por sua vez, infecta granulócitos, predominantemente neutrófilos, onde também se reproduz formando mórulas. Já houve relatos de infecção no homem, cães, felinos, equinos e ruminantes, além de uma grande variedade de pequenos mamíferos silvestres, apesar dessa diversidade de hospedeiro variar de acordo com a região geográfica (BJOERSDORFF et al., 1999; PUSTERLA et al., 1999). *Anaplasma phagocytophilum* pode alternar entre duas formas, pequenas células densamente coradas, as quais se ligam a alvos na célula do hospedeiro, e células reticulares que se multiplicam intracelularmente e então se transformam em células densamente coradas que são liberadas quando a célula do hospedeiro se rompe (LAI et al., 2009; POPOV et al., 1998).

Anaplasma phagocytophilum, após entrada na célula, impede a fusão do fagolisossomo e causa bloqueio nos mecanismos oxidativos da respiração celular que são responsáveis pela eliminação dos organismos invasores (MOTT e RIKIHISA, 2000; WANG et al., 2002), garantindo a sobrevivência do agente e prejudicando a capacidade do hospedeiro de responder a infecção. Vale ressaltar que em gatos o modo de transmissão e os vetores ainda não foram totalmente esclarecidos.

A infecção por *A. phagocytophilum* em gatos é caracterizada por febre, mialgias, dores articulares, linfadenomegalia, claudicação, doença periodontal, conjuntivite e sinais neurológicos (LITTLE, 2010). Em estudo com cães, foi observado que a maioria dos animais naturalmente infectados permanece saudável, como indicado por evidências sorológicas de exposição em áreas endêmicas, na ausência de um histórico de doença clínica (BEALL et al., 2008; FOLEY et al., 2001). Porém, no caso de doença com manifestação clínica os achados são hiperestesia, mialgia, artralhas, rigidez de pescoço, claudicação, incoordenação, neutrofilia com desvio a esquerda, linfopenia, além de outros sinais clínico-laboratoriais comuns à erliquiose canina (BJOERSDORFF et al., 1999; TARELLO, 2005).

2.6 Importância em saúde pública

Algumas espécies Anaplasmataceae são conhecidas por causar doenças em humanos, incluindo *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*, *Neorickettsia sennetsu*, *E. muris* e *Neohrlichia mikurensis*. Alguns são importantes problemas de saúde pública e relatos de casos aumentam continuamente em todo o mundo (STUBBS et al., 2000; MAGGI et al., 2013; BAKKEN et al., 1996; DUMLER et al., 2007; COSTA et al., 2006; PRITT et al., 2009; PADDOCK et al., 2001; MAEDA et al., 1987; NICHOLSON et al., 2010).

Nos Estados Unidos, o quadro de prevalência de doenças transmitidas por carrapatos apresenta a Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH) e a Erliquiose Monocítica Humana (EMH), causada por *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis*, respectivamente, como a terceira e a quarta doenças transmitidas por carrapatos mais comuns no país, atrás somente da Doença de Lyme e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (DUMLER, 2005).

No Brasil houve relatos de casos suspeitos de EMH em Minas Gerais, onde se observaram títulos de anticorpos para *E. chaffeensis* em dois pacientes com sintomatologia clínica (CALIC et al., 2005) e em 1,2% (9/771) pacientes com doença febril atendidos em hospitais de Juiz de Fora, MG (COSTA et al., 2006).

Recentemente, houve a detecção molecular de *A. platys* em co-infecção com *Bartonella henselae* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* em uma médica veterinária, causando dores de cabeça, doença repentina incluindo status epilético e outras anomalias neurológicas e neurocognitivas (MAGGI et al., 2013), reforçando a importância deste agente em saúde pública.

Ehrlichia sp. é capaz de causar doença grave em humanos, com casos de óbito principalmente em crianças, imunocomprometidos e idosos (PEREZ et al., 2006). Quadros clínicos diversos são relatados em pessoas com sorologia positiva para *E. canis* ou infectadas por microrganismo semelhante à *E. canis*, como febre, mialgia, fraqueza e confusão mental (DORAN et al., 1989; FISHBEIN et al., 1987; GOLDEN et al., et al., 1989; MAEDA et al., 1987).

A Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH) é caracterizada por uma doença febril semelhante à gripe que ocorre após a picada por carrapatos (BAKKEN et al., 1996), sendo geralmente leve e auto-limitante. Também pode causar fadiga, dores articulares, dor de cabeça, mialgia e febre (STEERE et al., 1983; AGUERO-ROSENFELD et al., 1996; BAKKEN et al., 1996; PETROVEC et al., 1997). Como achados da AGH pode-se relatar depleção linfóide esplênica, agregados de macrófagos e apoptose no fígado, hiperplasia paracortical e células hemofagocíticas dentro dos tecidos do sistema fagocítico mononuclear (LEPIDI et al., 2000). Manifestações neurológicas já foram descritas em pessoas com AGH, quando o organismo foi detectado no fluido cefalorraquidiano (LEE et al., 2000). Análises laboratoriais de sangue periférico normalmente não revelam alterações hematológicas. No entanto, pode ser observada uma leve leucopenia associada a trombocitopenia ou às vezes um desvio neutrofílico à esquerda, como também um leve a moderado aumento na atividade das transaminases hepáticas (BAKKEN; DUMLER, 2008; BAKKEN et al., 1996; DUMLER et al., 2007). A forma grave da doença tende a ocorrer em humanos de idade avançada, ou naqueles com doença imunossupressora concomitante ou terapia medicamentosa (DUMLER et al., 2007). Devido à forma branda da doença, é possível que ocorram subnotificações para registro de caso.

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Detecção direta por esfregaço sanguíneo

O diagnóstico laboratorial dos agentes da família Anaplasmataceae é realizado rotineiramente pela identificação direta de mórulas em esfregaços sanguíneos. Apesar de ser uma técnica rápida e prática, na maioria dos casos de infecção natural, não é totalmente confiável, já que a parasitemia é variável e, geralmente, um pequeno número de células são infectadas (NAKAGHI et al., 2008).

Deve-se levar em conta também a possibilidade de outros diagnósticos diferenciais, como inclusões virais, *Leishmania donovani*, *Hepatozoon canis*, *B. canis* e *B. gibsoni* fagocitadas e/ou sobrepostas serem confundidas com inclusões de agentes Anaplasmataceae (NEITZ; THOMAS, 1938). Além disso, precipitados de corantes e artefatos sobre os leucócitos podem ser confundidos com estruturas características desses agentes (DAGNONE et al., 2001).

Como alternativa para aumentar a sensibilidade do diagnóstico microscópico, a literatura propõe a confecção do esfregaço sanguíneo a partir da primeira gota de sangue capilar, com a justificativa de que essa gota contém muito mais células mononucleares do que as gotas seguintes (NEITZ; THOMAS, 1938).

Além do esfregaço sanguíneo convencional e de capa leucocitária, o uso do diagnóstico citológico de linfonodos pode levar a um diagnóstico definitivo na fase aguda da doença (MYLONAKIS et al., 2003).

Nos cães, sabe-se que é importante pesquisar mais atentamente as inclusões granulocíticas e adotar algum outro método de diagnóstico que não seja apenas a detecção por esfregaço sanguíneo, pois *E. ewingii* apresenta inclusões semelhantes as de *A. phagocytophilum*. Assim, em gatos tal sugestão também se torna válida (GOLDMAN et al., 1998).

2.7.2 Isolamento em cultura de células

O isolamento de *E. canis* em culturas de células demonstrou ser o método mais sensível e definitivo para o diagnóstico inicial da erliquiose, porém requer muito tempo para a obtenção de resultados positivos, cerca de 14 a 34 dias. Também necessita de estrutura física, profissional experiente e equipamentos adequados, inviabilizando seu uso como método de diagnóstico de rotina (IQBAL et al., 1994). Porém, o cultivo celular ainda é considerado a modalidade mais sensível de diagnóstico para detecção de infecção aguda em pacientes humanos (AGUERO-ROSENFELD et al., 2002).

Para o isolamento de *E. canis* já foi descrita inoculação em células do tipo macrófagos de linhagem de camundongos BALB/C (KEYSARY et al., 2001), células originárias de histiocitoma canino DH82 (AGUIAR et al., 2007), uma linhagem de células microvasculares de endotélio humano (DAWSON et al., 1993), monócito primário canino (HELMET et al., 1980) e macrófago peritoneal canino (STEPHENSON; OSTERMAN, 1977). Todas as cepas de *A. phagocytophilum* podem ser cultivadas *in vitro* na linhagem de células HL-60 humana. Este método é usado em pesquisas, mas não está comercialmente disponível, não sendo utilizado para fins de diagnóstico (GREENE, 2006).

2.7.3 Testes sorológicos

Há uma grande diversidade de testes sorológicos que podem ser utilizados no diagnóstico das infecções por agentes Anaplasmataceae. Estes são uma alternativa viável e de grande aplicação nos estudos de levantamento epidemiológico. Mas reações cruzadas podem ocorrer, já que as espécies de erliquias dividem antígenos em comum.

A sorologia pode fornecer resultados negativos durante a primeira semana de infecção, uma limitação destes testes que não detectam a infecção em sua fase aguda (WALKER; DUMLER, 1996; WANER et al., 2001; PADDOCK; CHILDS, 2003) e também não diferencia um quadro de infecção atual de um quadro de exposição sem infecção propriamente dita ou de uma infecção prévia (SHAW et al., 2001). Deve-se também levar em consideração a variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos e ao antígeno utilizado (SHAW et al., 2001).

O teste padrão ouro das sorologias é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos Imunoglobulina G (IgG) anti-*E. canis*. Anticorpos IgG apresentam títulos consistentes havendo um aumento de quatro vezes na fase aguda, além de permanecerem circulantes por vários meses após eliminação do agente (BARTSCH; GREENE, 1996). Já os anticorpos Imunoglobulina M (IgM) não são considerados um indicador confiável de exposição, devido sua produção inconsistente durante a infecção (MCBRIDE et al., 2003).

A RIFI é considerada um bom método de diagnóstico, pois detecta anticorpos séricos em animais portadores ou com infecção crônica que mantém parasitemia baixa ou não detectável ao microscópio óptico (AGUIAR et al., 2007). Aliado a isso, é um método prático, simples e sensível e, comparada aos demais métodos de diagnóstico, não requer equipamentos caros, se tornando mais acessível para diagnóstico na rotina clínica e laboratorial. Porém, necessita de profissional experiente para a leitura das lâminas, o que torna o resultado subjetivo.

Uma alternativa bastante utilizada atualmente são os “kits” comerciais de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), pois fornecem um diagnóstico rápido e de baixo custo. Porém, esses testes são meramente qualitativos, oferecendo apenas resultados positivos e negativos, sem titulação. Não se observa diferença significativa entre RIFI e testes ELISA comerciais (HARRUS et al. 2002). Em um estudo comparando o “dot-blot ELISA” com a RIFI, foi observado que o “dot-blot ELISA” é tão sensível e específico para a detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis* quanto a RIFI, tanto em infecções naturais quanto em experimentais (NAKAGHI et al., 2004). Além de apresentar as vantagens da rapidez, não requer equipamentos caros, apresenta facilidade da leitura dos resultados, e proporciona um registro permanente (CADMAN et al., 1994; NAKAGHI et al., 2004).

O “Western Immunoblotting” é um teste com sensibilidade próxima a da RIFI, que identifica o agente através das digitais do seu perfil proteico imunogênico. Apresenta a vantagem de ter uma leitura objetiva, já que não sofre influência da subjetividade do operador. Também é mais específica, sendo utilizada para caracterizar e distinguir os diferentes organismos resolvendo os problemas de reação cruzada. Contudo, é uma técnica mais custosa e trabalhosa, que necessita de mais tempo e de tecnologia mais avançada que a RIFI, não sendo indicada para o diagnóstico na rotina clínica (ANDEREG; PASSOS, 1999; HARRUS et al., 2011).

Não há relatos de reação cruzada entre *A. platys* e *E. canis* utilizando a RIFI, entretanto pode ocorrer reação sorológica cruzada entre *A. platys* e *A. phagocytophilum* (GREENE, 2006). Reatividade sorológica cruzada entre *A. phagocytophilum* e *E. canis* também foi relatada, mas parece ser menos frequente (POITOUT et al., 2005; PLIER et al., 2009; BREITSCHWERDT et al., 1998).

2.7.4 Detecção molecular

As técnicas em biologia molecular ganham cada vez mais destaque, permitindo a detecção e a caracterização de novos patógenos (SANTOS et al., 2011). A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica amplamente aplicada em diversas áreas do diagnóstico molecular. É uma tecnologia flexível, que permite análise de uma grande variedade de amostras detectando uma sequência de interesse presente em uma amostra complexa de DNA (MOLINA; TOBO, 2004).

A nested-PCR é altamente sensível, pois é capaz de detectar 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis*, enquanto que uma só amplificação de DNA permite detectar apenas valores acima de 20 pg (WEN et al., 1997), sendo portanto uma alternativa mais sensível para detecção deste e outros agentes Anaplasmataceae.

Outra variante da técnica de PCR é a PCR multiplex, a qual é desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra, na mesma reação, pelo uso de mais de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Apresenta como vantagens a economia de tempo e reagentes, e ainda, pode facilitar estudos epidemiológicos moleculares que necessitem da triagem de um grande número de potenciais vetores e populações de reservatório (COURTNEY et al., 2004).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica capaz de fornecer resultados quantitativos, permite o acompanhamento da reação e a obtenção dos resultados de forma mais precisa e rápida em comparação à PCR convencional que apresenta resultados qualitativos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Além disso, é desnecessário o processamento pós-PCR como a eletroforese em gel de agarose. Através da avaliação do “CycleThreshold” (C_T) se consegue avaliar o ciclo exato onde a reação atinge o limiar de detecção e, com isso, comparar todas as amostras, sendo o sistema de detecção baseado na quantificação da fluorescência gerada durante a reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A qPCR é menos propensa a contaminações do que a PCR convencional e se houver algum tipo de contaminação esta é facilmente detectável através da análise das curvas de “melting” (PEREIRA, 2012). Dois sistemas de quantificação são utilizados de forma ampla e rotineira na técnica de qPCR, o SYBR[®] Green e o Taq Man[®].

O SYBR[®] Green é um método de detecção menos específico. Este corante se liga entre a fita dupla de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens de sua utilização são o baixo custo, a facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ocorrência de ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo resultar em uma superestimação da concentração do fragmento alvo. A fluorescência é realçada quando as moléculas do SYBR[®] Green estão ligadas na fita dupla do DNA, já as não-ligadas apresentam fluorescência fraca, produzindo um sinal mínimo que é subtraído durante a análise de computador (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A sonda Taq Man[®] é um fragmento molde de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um quencher (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'-3' da Taq DNA Polimerase (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). É um método de detecção específica porque, além da ligação do par de primers, é necessário que a sonda hibridize no fragmento a ser amplificado.

A Análise de “melting” em Alta Resolução (HMR) é uma técnica que utiliza a qPCR desenvolvida inicialmente para genotipagem, avaliando polimorfismo em um nucleotídeo único (WITTEWER et al., 2003). Essa técnica pode ser útil na diferenciação entre diferentes cepas e espécies dos agentes Anaplasmatidae.

Para a detecção de agentes Anaplasmatidae na técnica de PCR e seus derivados o gene 16s *rRNA* é amplamente utilizado no seu diagnóstico, identificação e genotipagem (OLSEN; WOESE, 1993; PEREZ et al., 2006). É um gene conservado encontrado em todas as espécies de bactérias. Produtos de PCR deste gene têm sido utilizados para análise de sequências das espécies de *Ehrlichia*, para comparar as variações de cepas geograficamente dispersas (PEREIRA, 2012).

A identificação molecular de hemoparasitas seguida por sequenciamento de vários genes específicos tem sido utilizada para o diagnóstico dos agentes Anaplasmatidae, auxiliando na compreensão da doença e na identificação de reservatórios para espécies patogênicas para seres humanos e animais domésticos. Os estudos abordando a detecção de DNA dos membros da família Anaplasmatidae em felinos domésticos ainda são escassos, havendo poucos relatos na América do Norte, Europa e Ásia (YIN-CHIACHUN et al., 2003; LAPPIN et al., 2004) e recentemente no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009; LIMA et al., 2010; CORREA et al. 2011; BRAGA et al., 2012).

Nos últimos anos surgiram várias tecnologias disponíveis que permitem o sequenciamento de DNA com rendimento muito alto, chamados de sequenciamento de nova geração, bastante utilizados em estudos de metagenômica. Embora estas tecnologias fossem originalmente usadas para sequenciamento do genoma, os pesquisadores introduziram recentemente essas tecnologias de 'deep sequencing' ou '(ultra-) high throughput' para uma série de outras aplicações (BALWIERZ et al, 2009; XU et al. , 2011).

As vantagens destes métodos são que eles combinam a capacidade de detecção específica da PCR em tempo real com o suporte direto de evidência baseada na sequência, bem como o potencial para analisar um amplo espectro de agentes infecciosos ou genes, sem a necessidade de criar primers de PCR, e assim, qualquer conhecimento a priori específico dos agentes infecciosos que podem estar presentes. Outras vantagens destes métodos incluem a descoberta de fragmentos de DNA completamente desconhecidos e inesperados a partir de agentes infecciosos descaracterizados anteriormente.

Desvantagens do sequenciamento profundo incluem atual alto custo, a geração de grande volume de dados dependentes da sequência, muito mais do que com dados de microarranjos, portanto, para a análise são necessários novos programas de bioinformática, ferramentas e suporte projetado especificamente para esta finalidade (CZERNIECKI & WOŁCZYŃSKI, 2011).

O uso de técnicas específicas de diagnósticos, aliadas ao conhecimento das hemoparasitoses ocorrentes no Brasil permitirá avaliar se há ou não distinção entre os agentes que acometem humanos e animais domésticos, além de fornecer novas opções de diagnóstico, assim como ampliar sua utilização na medicina veterinária.

2.8 Tratamento e profilaxia

Assim como na erliquiose canina, os fármacos de escolha para o tratamento de infecção por agentes Anaplasmatidae em felinos são a tetraciclina e a doxiciclina (ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY; MASSARD, 1999; BJOERSDORFF et al., 1999; LAPPIN et al., 2004; TARELLO et al., 2005). Animais com infecção crônica possuem prognóstico ruim, podendo apresentar melhora gradual ou nenhuma melhora após o tratamento, sendo que nos casos mais

severos o tratamento prolongado é necessário (GREENE; HARVEY, 1990). Terapia suporte como fluidos, transfusão sanguínea, vitaminas, corticoides ou esteroides anabólicos podem ser utilizados (COHN, 2003).

A profilaxia deve tomar como base o controle efetivo dos carrapatos. No caso de transporte de animais de áreas endêmicas para áreas livres, estes devem ser testados e, se necessário, tratados anteriormente (HUXSOLL et al., 1970). Acrescentando, para que o animal sirva como doador de sangue, o ideal é que passe por triagem com testes sorológicos ou moleculares (REINE, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ, sob o processo 23083004088/2013-94 e no IBAMA (Sisbio, n. 47791). O estudo foi realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foram coletadas amostras de sangue de 105 gatos domésticos de abrigo (população 1), provenientes de 9 abrigos localizados nas cidades de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Seropédica, Itaguaí e Belford Roxo. Os animais compreenderam 55 fêmeas e 50 machos, com idade estimada de 1 mês a 9 anos, sendo apenas um da raça Siamês e os demais sem raça definida. Paralelamente, foram coletadas amostras de 178 gatos submetidos à atendimento clínico em clínica veterinária especializada (população 2), sendo 77 fêmeas e 101 machos, com idade de 1 mês a 19 anos, das raças Persa (19), Siamês (11), British shorthair (4), Himalaio (2), Azul da Rússia (1), Exótico de pêlo curto (1), Ragdoll (1), Maine Coon (1) e sem raça definida (138).

Também foram coletadas amostras de 37 gambás (*Didelphis aurita*), sendo 30 provenientes do CRAS (Centro de Recuperação de Animais Silvestres) da Universidade Estácio de Sá e 7 do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres).

No momento da coleta de sangue foram observados dados relacionados ao hospedeiro (sexo, idade, raça, etc) utilizados posteriormente para avaliar possíveis associações com a positividade e comparação entre as populações.

3.2 Coleta de Sangue

De cada animal foram coletadas amostras únicas de sangue (aproximadamente 4 mL) em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), através de venopunção cefálica ou jugular.

O sangue foi mantido refrigerado em caixa isotérmica com gelo reciclável durante o transporte até o Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As amostras de sangue foram empregadas nas análises hematológicas dentro de 24 horas e, posteriormente, foram armazenadas a -80°C para utilização nas análises de biologia molecular.

3.3 Análise Hematológica

A contagem global de leucócitos (Lt), hemácias (He) e plaquetas, as determinações de hemoglobina (Hb), volume globular (VG) e índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram realizados utilizando o contador automático de células Poch 100 (Roche), de acordo com as recomendações do fabricante.

A contagem diferencial de leucócitos (leucometria específica) e a análise da morfologia eritrocitária foram realizadas através de esfregaços de sangue total corados com corante instantâneo (Panótico Rápido®), analisados por microscópio óptico, objetiva de 100x, segundo Jain (1993). A pesquisa dos agentes foi realizada sob microscopia de luz (x100) nas lâminas coradas, observando em média 20 campos.

3.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

3.4.1 Extração de DNA de sangue total

As amostras de sangue colhidas em solução de EDTA foram submetidas ao processo de extração de DNA total com o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total foi utilizado como controle negativo 200 µL de água ultra-pura esterilizada (Invitrogen®) em cada bateria de amostras processadas. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.4.2 Reações de amplificação (nested-PCR) para *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* spp. baseadas no gene 16S *rRNA*

A detecção molecular de *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* e *Anaplasma* spp. baseada no gene 16S *rRNA* foi realizada segundo oligonucleotídeos iniciadores de referência para detecção destes agentes (Tabela 1) e condições de termociclagem demonstradas na tabela 2. Nas reações de PCR foram utilizados 5µL (aproximadamente 30ng/µL) de DNA da amostra, além de 1,25 Utaq DNA Polimerase (Life Technologies®), Tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Life Technologies®), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Life Technologies®) e água ultra-pura esterilizada (Life Technologies®) p.s.p. 25µL. Nas reações de nested-PCR, foram utilizados 1µL do produto amplificado da primeira reação de PCR, em um mix contendo os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação. Amostras de DNA controle positivo de *E. canis*, *E. chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum*, foram gentilmente cedidas pela professora Rosângela Zacarias Machado, UNESP-Jaboticabal.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR e nested PCR, utilizadas para detecção molecular de *Ehrlichia* sp., *E. canis*, *E. chaffeensis* e *Anaplasma* spp. baseadas no gene 16S *rRNA*.

Agente e Primers	Sequências de oligonucleotídeos	Tamanho do produto da PCR	Referências
<i>Ehrlichia</i> spp.			
- ECC	5'- GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3'	478	MURPHY et al., 1998
- ECB	5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'		
Nested <i>E. canis</i>			
- ECAN-5	5'-AATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3'	358	MURPHY et al., 1998
-HE3	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT-3'		

Nested <i>E. chaffeensis</i>				
- CHAFF	5'- CAA TTGCTTATAACCTGGTTATAAAT-3'	410	KOCAN et al., 2000	
-GAIUR	5'-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3'			
<i>Anaplasma</i> spp.				
-gE3a	5'- CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'	932	MASSUNG et al., 1998	
-gE10R	5'- TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC'-3'			
Nested <i>Anaplasma</i> spp.				
-gE2	5'- GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'	546		
-gE9f	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'			

Tabela 2. Descrição das sequências térmicas e de tempo para as reações de PCR e nested PCR para detecção de *Ehrlichia* sp., *E. canis*, *E. chaffeensis* e *Anaplasma* spp. baseadas no gene 16S *rRNA*.

Reação/ Agente	Sequências Térmicas
PCR <i>E. canis</i>	- 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C
nPCR <i>E. canis</i>	72°C por 5 minutos - 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C
PCR <i>E. chaffeensis</i>	72°C por 5 minutos - 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C
nPCR <i>E. chaffeensis</i>	72°C por 5 minutos - 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C
PCR <i>Anaplasma</i> spp.	72°C por 5 minutos - 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C
nPCR <i>Anaplasma</i> spp.	72°C por 5 minutos - 94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C

3.4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 90 V/50 mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb ou 1kb (Life Technologies®). Os resultados foram visualizados e analisados através de transiluminador de luz ultravioleta acoplado ao analisador de imagem (L-pixtouch da Loccus Biotecnologia).

3.5 Sequenciamento de Nucleotídeos e Caracterização Molecular dos Isolados

Os produtos da amplificação das reações de PCR foram purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado através do método automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5µL do Tampão 2,5x (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂); 0,5µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5µL de água ultra-pura e 1,5µL de DNA (sendo este ajustado de acordo com sua concentração, mensurada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, Thermoscientific). O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp Jaboticabal).

As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram submetidas a alinhamento e análise no Laboratório de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular (FCAV- UNESP Jaboticabal). A triagem foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes à cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. O programa CAP3 (<http://pbil.univ-771yon1.fr/cap3.php>) foi utilizado para realizar o alinhamento da sequência consenso. O programa BLAST foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTn), objetivando-se procurar e comparar sequências similares em banco de dados internacionais (GenBank) (BENSON et al., 2002) com aquelas obtidas.

3.6 Cuidados para evitar contaminações

Para verificar eventual contaminação dos reagentes e enzimas, um tubo contendo todos os componentes da PCR, com exceção da amostra de DNA, foi incluído em cada reação. A amostra de DNA foi substituída por uma quantidade equivalente de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®), caracterizando o controle negativo. Também em cada reação foi adicionado um tubo contendo DNA sabidamente positivo para validar a reação.

Foram utilizadas ponteiras com filtro em todas as fases do experimento, e os procedimentos de extração de DNA, e as reações de PCR foram realizadas em salas separadas. O preparo das reações e a pipetagem das amostras contendo DNA foram realizados em capela de fluxo laminar distintas, esterilizadas com luz ultravioleta imediatamente antes de cada reação. Todas as reações de PCR foram realizadas em sistema fechado.

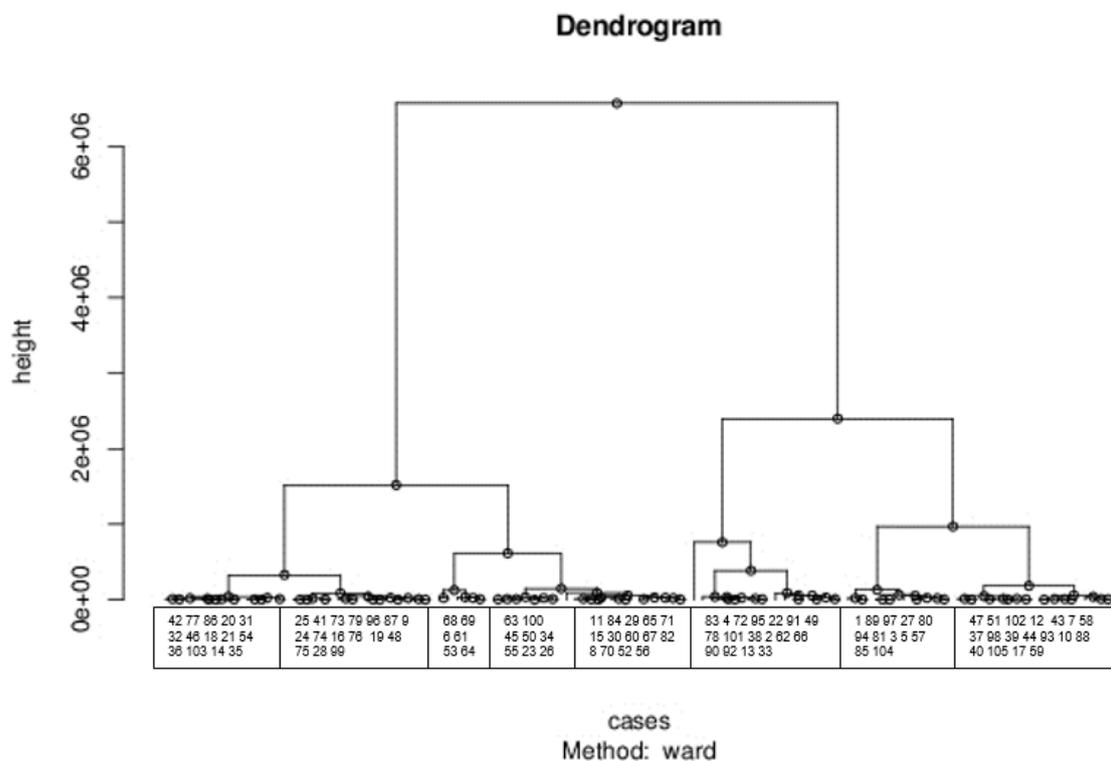
3.7 Análise Estatística

Os valores dos parâmetros hematológicos das duas populações de gatos do estudo foram submetidos a análise de variância e comparados através do teste F, em nível de 5% de significância, quando estes apresentaram distribuição normal. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Mann-Whitney em nível de 5% de significância. A frequência das alterações hematológicas entre as populações foi comparada através do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado em nível de 5% de significância. As variáveis obtidas através do questionário epidemiológico: sexo, raça, idade e castração foram comparados entre as populações por análise de frequência. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 4.0 (AYRES, 2000).

3.8 Análises de Metagenômica

Para as análises de Metagenômica, as amostras de felinos domésticos de abrigos e domiciliados foram divididas em dendrogramas contendo oito grupos em cada população, a divisão ocorreu utilizando as informações obtidas no momento da coleta (sexo, raça, idade, castração e alterações hematológicas), que foram resumidas em código binário e submetidos à um programa de divisão em *clusters* (rwasp hierarchical clustering – WESSA-https://www.wessa.net/rwasp_hierarchicalclustering.wasp) (Figura 1 a e b).

(a)



(b)

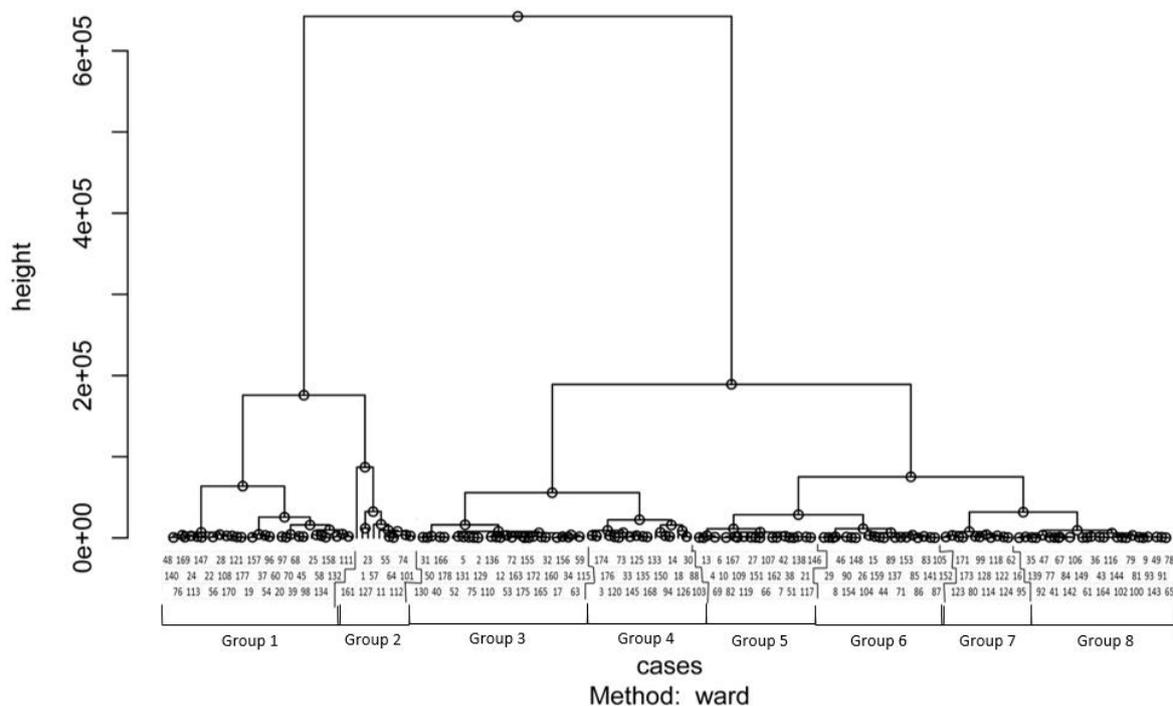


Figura 1. Dendrograma contendo amostras de gatos domésticos oriundos de abrigos (a) e domiciliados (b) divididas em 8 grupos utilizando um programa de divisão em clusters (rwasp hierarchical clustering - WESSA).

Foram selecionados 40% de indivíduos de cada população (40 de abrigos e 72 da clínica) para análise metagenômica, respeitando a proporção entre os grupos do dendrograma. Pelo fato do genoma do hospedeiro (gato doméstico) não ser totalmente mapeado, efetuou-se o sequenciamento do gene 16SrRNA, para identificação das bactérias presentes no DNA. Vale ressaltar que não há na literatura atual o genoma completo do gato, por isso, em um sequenciamento de genoma total, não seria possível separar quais “reads” são do hospedeiro e quais dos patógenos, por isso a escolha pelo gene 16SrRNA. A análise foi realizada no Institute for Genome Science – The University of Maryland, utilizando a Tecnologia de Sequenciamento Illumina®.

Foi realizada uma triagem inicial com o programa Kraken (WOOD; SALZBERG, 2014) que é um sistema para classificação taxonômica de sequências curtas de DNA, normalmente obtidas através de estudos metagenômicos.

As demais análises foram executadas no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). A fim de remover sequências derivadas do hospedeiro, o genoma de *Felis catus* foi obtido do GenBank do NCBI e usado com referência no mapeamento pelo programa GMAP (WU & WATANABE, 2005), utilizando parâmetros default. Visto que o processo de sequenciamento pode gerar erros e sequências de baixa qualidade ou significativamente curtas, as quais podem comprometer as análises, os dados obtidos foram previamente submetidos a um controle de qualidade, utilizando-se os programas Trimmomatic, FastQC e FastQ/A_collapser.

O Trimmomatic (BOLGER et al., 2014) foi empregado para remoção de bases com qualidade <20 no início e final dos fragmentos sequenciados, bem como fragmentos de tamanho menor que 30 pb. Em seguida, os dados foram submetidos ao FastQC, e FastQ/A_collapser, presentes no pacote FASTX-toolkit 0.010 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). O FastQC foi usado para analisar o resultado das métricas previamente usadas e avaliar a qualidade do sequenciamento. Reads duplicados foram removidos dos dados através do programa FastQ/A_collapser.

Após o controle de qualidade, os reads restantes foram comparados por alinhamento com sequências não redundantes disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando o programa Diamond (BUCHFINK et al., 2015), aplicando um valor mínimo de e-value de 10^{-5} e cobertura de no mínimo 60% da “query”. Os grupos microbianos contidos nos metagenomas foram identificados através do algoritmo de classificação taxonômica LCA (Lowest Common Ancestor) do MEGAN (HUSON et al., 2011), com os parâmetros de escore mínimo de alinhamento = 100, e-value superior a 10^{-5} , identidade mínima de 60%, mínimo suporte de 5 "hits", porcentagem LCA = 80. Reads com baixa complexidade (inferior a 0.3) foram filtrados da análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUERO-ROSENFELD, M.E. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: State of the art. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.2, n.4, p.233–239, 2002.
- AGUERO-ROSENFELD, M.E., HOROWITZ, H.W., WORMSER, G.P., MCKENNA, D.F., NOWAKOWSKI, J., MUNOZ, J., DUMLER, J.S. Human Granulocytic Ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. **Ann. Intern. Med.** v.125, p.904–908. 1996.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- ALMOSNY, N.R.P.; ALMEIDA, L.E; MOREIRA, N.M.; MASSARD, C.L. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.5, n.2, p.82-83, 1998.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: Ed.L.F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p.13- 56.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose felina – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.4, n.23, p.30-32, 1999.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina - Revisão. **Clínica Veterinária**. A. IV, n.19, p.31-38, 1999.
- ANDRÉ M.R. Detecção molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em felídeos silvestres brasileiros mantidos em cativeiro. **Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp**, Campus de Jaboticabal, São Paulo. 2008, 78p.
- ANDRÉ M.R., DUMLER J.S., SCORPIO D.G., TEIXEIRA R.H.F., ALLEGRETTI S.M., MACHADO R.Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases** v.3, p.247– 253, 2012.
- ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; SILVA, K.F.; NAKAGHI, A.C.H. Molecular and Sorologic Detection of *Ehrlichia* spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v.46, n.3, p.1017-1023, 2010.
- ANDRÉ, M.R.; BACCARIM DENARDI, N.C.; MARQUES DE SOUSA, K.C.; GONÇALVES, L.R.; HENRIQUE, P.C.; GROSSE ROSSI ONTIVERO, C.R.; LIMA GONZALEZ, I.H.; CABRAL NERY, C.V.; FERNANDES CHAGAS, C.R.; MONTICELLI, C.; ALEXANDRE DE SANTIS, A.C.; MACHADO, R.Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.** v.5, n.5, p.545-51, 2014.

AYRES, M. **BioEstat 2.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2000. 272 p.

BAKKEN, J.S., KRUEH, J., WILSON-NORDSKOG, C., TILDEN, R.L., ASANOVICH, K., DUMLER, J.S. Clinical and laboratory characteristics of Human Granulocytic Ehrlichiosis. **JAMA**, v.275, p.199–205. 1996.

BAKKEN, J.S.; DUMLER, S. Human granulocytic anaplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.22, n.12, p.443-448, 2008.

BALWIERZ P.J., CARNINCI P., DAUB C.O., KAWAI J., HAYASHIZAKI Y., BELLE W.V., BEISEL C., NIMWEGEN E.V. Methods for analyzing deep sequencing expression data: constructing the human and mouse promoterome with deepCAGE data. **Genome Biology** 10:R79, 2009.

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

BEALL, M.J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, M.D.; CYR, K.E.; DINIZ, P.P.; MAINVILLE, C.; HEGARTY, B.C.; CRAWFORD, J.M. BREITSCHWERDT, E.B. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia species* in dogs from Minnesota. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.4, p.455-464, 2008.

BEAUFILS, J. P.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.; BARBAULT-JUMELLE, M. Ehrlichiose probable chez le chat: etude retrospective sur 21 cas. **Pratique Médecine Chir Animal Compagnie**, n.34, p.587-596, 1999.

BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, n.1, p.17-20, 2002.

BILLETTER S.A, Spencer J.A., Griffin B., Dykstra C.C., Blagburn B.L. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. **Vet. Parasitol.** V.147(1/2) p.194-198. 2007.

BJÖERSDORFF A, SVENDENIUS L, OWENS JH, MASSUNG RF. Feline granulocytic ehrlichiosis—a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. **J Small Animal Practice**. 1999;40:20–4. doi: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03249.x.

BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B.; Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics** 2014; 30 (15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

BRAGA I.A.; SANTOS L.G.F.; MELO A.L.T.; JAUNE F.W.; ZILIANI T.F.; GIRARDI A.F.; AGUIAR D.M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 22, n. 4, p. 470-474, out.-dez. 2013.

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

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2645-2651, 1998

BUCHFINK, B., XIE, C. & HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods** 12, 59–60 (2015)

CADMAN, H.F.; KELLY, P.J.; MATTHEWMAN, L.A.; ZHOU, R.; MASON, P.R. Comparison of the dot-blot enzyme-linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v.135, n.15, p.362, 1994.

CALIC, S.B.; BARCELLO-ROCHA, C.M.; LEITE, R.C.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A.M. Old and new human rickettsiosis in Minas Gerais State, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1063, p.356-357, 2005.

CHARPENTIER, F.; GROULADE, P. Probable case of Ehrlichiosis in a cat. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**. v.3, n.59, p.287-90, 1986.

COHN L.A. Ehrlichiosis and related infections. *Vet. Clin. North Am.*, **Small Anim. Pract.** v. 33, n.4, p.863-84, 2003.

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

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

COURTNEY, J.W.; KOSTELNIK, L.M.; NORDIN, S.Z.; MASSUNG, R.F. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3164-3168, 2004.

CZERNIECKI J. & WOŁCZYŃSKI S., Deep sequencing – a new method and new requirements of gene expression analysis. **Studies In Logic, Grammar And Rhetoric** v.25 p.38, 2011.

DA SERRA FREIRE, N.M., *Babesia ernestoi* sp. n., in *Didelphis marsupialis* L., 1758, and *D. albiventris* Lund, 1841, in Brazil. **Zentralbl. Veterinarmed.** B v.26, p.614-622, 1979.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.285-290, 2003.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.191-201, 2001.

DAWSON, J. E.; CANDAL, F. J.; GEORGE, V. G.; ADES, E. W. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. **Pathobiology**. v.61, n.5-6, p.293-296, 1993.

DORAN, T.I.; PARMLEY, R.T.; LOGAS, P.C.; CHAMBLIN, S. Infection with *Ehrlichia canis* in a child. **Journal of Pediatrics**, v.114, n.5, p.809-812, 1989.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; STUART, C. R.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J.S.; CHOI, K.S.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BARAT, N.S.; SCORPIO, D.G.; GARYU, J.W.; GRAB, D.J.; BAKKEN, J.S. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases** v.11, p.1828–1834, 2005.

DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J.S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, Suppl. 1, p.S45–S51, 2007.

EWING, B., HILLIER, L; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, New York, v.8, n.3, p.175-1985, 1998.

FILONI, C., CATÃO-DIAS, J.L., BAY, G., DURIGON, E.L., JORGE, R.S., LUTZ, H., HOFMANNLEHMANN, R., First evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. **J. Wildl. Dis.** v.42, p.470–477, 2006.

FILONI, C., CATÃO-DIAS, J.L., CATTORI, V., WILLI, B., MELI, M.L., RAMIRO CORRÊA, S.H., CRISTINA MARQUES, M., HARUMI ADANIA, C., RAMOS SILVA, J.C., VIANNA MARVULO, M.F., FERREIRA NETO, J.S., LUIZ DURIGON, E., DE CARVALHO, V.M., DALL'ACQUA COUTINHO, S., LUTZ, H., HOFMANNLEHMANN, R., Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.24, p.166–173, 2012.

FISHBEIN, D.B.; SAWYER, L.A.; HOLLAND, C.J.; HAYES, E.B.; OKOROANYANWU, W.; WILLIAMS, D.; SIKES, R.K.; RISTIC, M.; McDADE, J.E. Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks: infection with an *Ehrlichia*? **Journal of American Medical Association**, v.257, n.22, p.3100-3104, 1987.

FOGGIE, A. Studies on tick-borne fever. **Journal of General Microbiology**. III: Proceedings, v-vi. 1949.

FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; MADIGAN, J.E. Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.10, p.1599-1605, 2001.

FONTALVO, M.C.; BRAGA, I.A.; AGUIAR, D.M.; HORTA, M.C. Evidências sorológicas da exposição de gatos a *Ehrlichia canis*. **Ciênc. anim. bras.**, vol.17, n.3, pp.418-424. 2016.

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

GOLDEN, S.E.; SPRINGFIELD, M.O. Aseptic meningitis associated with *Ehrlichia canis* infection. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**. v.8, n.5, p.335-337, 1989.

GOLDMAN, E.E.; BREITSCHWERDT, E.B.; GRINDEM, C.B.; HEGARTY, B.C.; WALLS, J.J.; DUMLER, J.S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.12, n.2, p.61-70, 1998.

GREENE, C.E. **Infectious diseases of The Dog and Cat**. St. Louis: Saunders, 2006. Cap. 28, 1387p.

GREENE, C.E.; HARVEY, J.W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB. Saunders Company, p.405-414, 1990.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.36, n.1, p.937-940, 1975.

GUIMARÃES A. **Diagnóstico Morfológico, Sorológico e Molecular de Agentes Anaplasmataceae em Felinos Domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro**. 2013. 62f. Tese (mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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*. **Veterinary Microbiology**, v.86, n.4, p.361-368, 2002.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestation of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v.141, n.10, p.247-250, 1997a.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.19, n.4, p.431-444, 1997b.

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

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**, Washington, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T.; FREIDMAN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z.; BARK, H.; HARMELIN, A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary immunology and Immunopathology**. v.96, n.3-4, p.239-243, 2003.

HARVEY, J.W. *Ehrlichia platys* infection (Infectious Cyclic Thrombocytopenia of Dogs) In. GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, cap.37 p.415-418. 1990.

HEIKKILA, H.M.; BONDARENKO, A.; MIHALKOV, A.; PFISTER, K.; SPILLMANN, T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in domestic cat in Finland: case report. **Acta Veterinaria**, p.52-62, 2010.

HELMET, I.E. et al. Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocytes cultures. **Cornell Vet**, v.70, p.37-42, 1980.

HERRERA, L., URDANETA-MORALES, S., *Didelphis marsupialis*: reservoir of *Babesia braziliensis* in the valley of Caracas (Venezuela). **Acta Cient. Venez.** v.42, p.45-46, 1991.

HIBLER, S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **The Compendium On Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.8 n.2 p.106-114, 1986.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, v.16, n.3, p.13-21, 1991.

HUSON, D. H., MITRA, S., RUSCHEWEYH, H. J., WEBER, N. & SCHUSTER, S. C. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. **Genome Res.** 21, 1552–1560 (2011)

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; FERGUSON, J. A.; WALKER, J. S. Ehrlichia canis - the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs? **Veterinary Record**, v.85, n.21, p.587, 1969.

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; WALKER, T.S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.157, n.11, p.1627-1632, 1970.

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

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, 417p., 1993.

JOHNSON, E.M.; EWING, S.A.; BARKER, R.W.; FOX, J.C.; CROW, D.W.; KOCAN, K.M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.74, n. 2-4, p.277-288, 1998.

KAKOMA, I.; SÁINZ, A.; TESOURO, M.; AMUSATEGUI, I.; KIM, C.H.; BIGGERSTAFF, J.; McPEAK, J.; LEVY, M.G. Standardization of the diagnostic criteria for Canine Ehrlichiosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916 p.396-403. 2000.

KEYSARY, A. et al. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.13, p.521-523, 2001.

KOCAN, A.A.; LEVESQUE, G.C.; WHITWORTH, L.C.; MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; BARKER, R.W. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.6, n.5, p.477-480, 2000.

LABRUNA, M.B., Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**v.1166, p.156–166, 2009.

LAI, T.H.; KUMAGAI, Y.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; RIKIHISA, Y. *The Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. **Journal Bacteriology**. v.191, n.3, p.693-700, 2009.

LAPPIN, M. R. Feline ehrlichiosis and hemobartonellosis. In: **World Small Animal Veterinary Association World Congress**. Anais.Vancouver, 2001.

LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A.; DUNNIGAN, B.; RHA, J.; WILLIAMS, C.R.; BREWER, M.; FALL, M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats of North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, n.6, p.893-896, 2004.

LEE, F.S.; CHU, F.K.; TACKLEY, M.; WU, A.D.; ATRI, A.; WESSELS, M.R. Human granulocytic ehrlichiosis presenting as facial diplegia in a 42-year-old woman. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, n.5, p.1288-1291, 2000.

LEPIDI, H.; BUNNELL, J.E.; MARTIN, M.E. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, n.1, p.29-37, 2000.

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

LINARDI, P. M. Os ectoparasitos de marsupiais brasileiros. In: Cáceres, N. C. & Monteiro-Filho, E. L. A. (eds). **Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução**. Editora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, p.37–52, 2006.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Vet.Clin.Small Anim.** v.40, p.1121-1141, 2010.

LURIA B.J., LEVY J.K., LAPPIN M.R., BREITSCHWERDT E.B., LEGENDRE A.M., HERNANDEZ J.A., GORMAN S.P. & LEE I.T. 2004. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **J. Feline Med. Surg.** v.6, n.5, p.287-96.

MACHADO, R.Z., DUARTE, J.M., DAGNONE, A.S., SZABÓ, M.P., Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Vet. Parasitol.** v.139, p.262–266, 2006.

MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; SOUZA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JUNIOR, J.R.F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.8, p.705-708, 2012.

MADEWELL, B.R.; GRIBBLE, D.H. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.80, n.5, p.512-514, 1982.

MAEDA, K., N. MARKOWITZ, R. C. HAWLEY, M. RISTIC, D. COX, AND J. E. MCDADE. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **N. Engl. J. Med.** v.316, p.853-856, 1987.

MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; HAVENGA, L.N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors.** v.6, p.103, 2013.

MARCONDES, C.B. Generalidades e Importância das Doenças Relacionadas com Artrópodes. In: MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**, p.1-3, 2009.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1090-1095, 1998.

MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.; WALKER, D.H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v.71, p.2516–2524, 2003.

MCDADE, J.E. Ehrlichiosis – A disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 609-617. April 1990.

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

MOTT, J. & RIKIHISA, Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. **Infection and Immunity**, v.68, n.12, p.6697-6703, 2000.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n.4, p.325-339, 1998.

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**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. ANDRADE, G.M. Detecção molecular de *Ehrlichia canis* pela “nested” PCR e avaliação de sua sensibilidade no diagnóstico da erliquiose canina. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v.13, n.1, p.356, 2004.

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

NEER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis In: GREENE, C.E. Infectious diseases of The Dog and Cat, **Hepatozoonosis**. St. Louis: Saunders, Cap. 28, p.203-216, 2006.

NEITZ, W. O; THOMAS, A. D. Rickettsiosis in the dog. **Journal of the South African Veterinary Medicine Association**, v.9, n.4, p.166-174, 1938.

NICHOLSON, W. L., K. E. ALLEN, J. H. MCQUISTON, E. B. BREITSCHWERDT, AND S. E. LITTLE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends Parasitol** v.26, p.205-212, 2010.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

OLIVEIRA, L.S.; MOURÃO, L.C.; OLIVEIRA, K.A.; DA MATTA AGOSTINI, M.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE ALMEIDA, M.R.; FIETTO, J.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; FILHO, J.D.; GALVÃO, M.A.; MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, Supl.2, p.53-54, 2009.

OLSEN, G.J; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.7, p.113–123, 1993.

ORTUÑO, A.; GAUSS, C.B.L.; GARCIA, F.; GUTIERREZ, J.F. Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from Northeastern Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.52, n.5, p.246-248, 2005.

PACHECO, R.C., HORTA, M.C., MORAES-FILHO, J., ATALIBA, A.C., PINTER, A., LABRUNA, M.B., Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica** v.27, p.364–371, 2007.

PADDOCK, C. D., S. M. FOLK, G. M. SHORE, L. J. MACHADO, M. M. HUYCKE, L. N. SLATER, A. M. LIDDELL, R. S. BULLER, G. A. STORCH, T. P. MONSON, D. RIMLAND, J. W. SUMNER, J. SINGLETON, K. C. BLOCH, Y. W. TANG, S. M. STANDAERT, AND J. E. CHILDS. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** v.33, p.1586-1594, 2001.

PADDOCK, C.D.; J.E. CHILDS. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.** v.16, p.37-64, 2003.

PENA, D.C., MAFRA, C.L., CALIC, S.B., LABRUNA, M.B., MILAGRES, B.S., WALKER, D.H., GALVÃO, M.A., Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.** v.15, p.243-244, 2009.

PEREIRA, A.M. **Detecção sorológica, molecular e análise filogenética de membros da Família Anaplasmataceae em cães naturalmente infectados no Rio de Janeiro.** 131f. Tese (doutorado) Universidade Federal Fluminense, 2012.

PEREZ, M. et al. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1078, n.1, p.110-117, 2006.

PETROVEC, M., FURLAN, S.L., ZUPANC, T.A., STRLE, F., BROUQUI, P., ROUX, V., DUMLER, J.S., Human disease in Europe caused by a Granulocytic *Ehrlichia* species. **J. Clin. Microbiol.** v.35, p.1556-1559. 1997.

PLIER, M.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; KIDD, L.B. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.45, n.5, p.232-238, 2009

POITOUT, F.M.; SHINOZAKI, J.K.; STOCKWELL, P.J.; HOLLAND, C.J.; SHUKLA, S.K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.796-801, 2005.

POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; FENG, H.M.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R.B.; WALKER, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, n.3, p.235-251, 1998.

PREZIOSI D.E.; COHN L.A. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.** v. 24 p.277-291. 2002

PRITT BS, SLOAN LM, JOHNSON DK, et al. Emergence of a new pathogenic *Ehrlichia* species, Wisconsin and Minnesota, **N Engl J Med.** v.365, n.5, p.422-9, 2009.

PUSTERLA, N.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; LUTZ, H. Serological evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.4, p.1168-9, 1999.

REDDY, G.R.; STRECK, C.P. Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent *Ehrlichia chaffeensis* suggests that it plays a role in immune evasion. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v.1, n.3, p.167-175, 1999.

REINE, N. J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n.2, p.68-74, 2004.

RIKIHISA, Y. The Tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.3, p.286-308, 1991.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, p.704-709, 1984.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

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

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. First report of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from Brazil detected by real-time PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, p.770-774, 2011.

SAVIDGE, C.; EWING, P.; ANDREWS, J.; AUCOIN, D.; LAPPIN, M.R.; MOROFF, S.; *Anaplasma phagocytophilum* infection of domestic cats: 16 cases from the northeastern USA. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, n.2, p.85-91, 2016.

SEUNG-HUN, L.; DORENE, V.; NEUNG-HEE, K.; SANG-JOON P.; OH-DEOG, K.; TAE-HWAN, K.; DONGMI, K.; First Molecular Detection and Genetic Analysis of *Anaplasma Phagocytophilum* in Shelter Cats in Seoul, Korea, **Infect Genet Evol** 46, 71-73. 2016.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Kidlington, v.3, n.4, p.193-209, 2001

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

STEERE, A.C.; BARTENHAGEN, N.H.; CRAFT, J.E.; HUTCHINSON, G.J.; NEWMAN, J.H.; RAHN, D.W.; SIGAL, L.H.; SPIELER, P.N.; STENN, K.S.; MALAWISTA, S.E.; The early clinical manifestations of Lyme disease. **Ann. Intern. Med.** v.99, p.76-82. 1983.

STEPHENSON, E.H.; OSTERMAN, J.V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.11, p.1815-1819, 1977.

STILES, J. Canine rickettsial infectious. **Vet.Clin.Nort.Am. Sm. An. Prac.**, v.30, p.1135-1150, 2000.

STUBBS, C. J.; HOLLAND, C. J.; REIF, J. S.; WHEELER, S.; BRUNS, C.; LAPPIN, M. R. Feline ehrlichiosis. **Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarians**, Yardley, v. 22, n. 4, p. 307-318, 2000.

STUBBS, C.J.; HOLLAND, C.J.; REIF, J.S.; WHEELER, S.; BRUNS, C.; LAPPIN, M.R. Feline ehrlichiosis. **The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarians**, Princeton, v.22, n.4, p.307-318, 2000.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. In. ETTINGER, S.J. (Ed.): **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2v. v.1, cap.46, p.277-281, 1989.

TARELLO, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. **Veterinary Record**, v.156, n.24, p.772-774, 2005.

THRALL M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2^a ed. Roca, São Paulo, 2015, 678p.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, n.1, p.18-29, 1996.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W.C.A. 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, n.1, p.1-15, 2001.

WANG, T.; MALAWISTA, S.E.; PAL, U.; GREY, M.; MEEK, J.; AKKOYUNLU, M.; THOMAS, V.; FIKRIG, E. Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. **The Journal of Infection Diseases**, v.186, n.2, p.274-280, 2002.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997.

WIDMER, C.E., AZEVEDO, F.C., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B., Tickborne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.11, p.1001–1005, 2011.

WITTEWER, C.T.; REED, G.H.; GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; PRYOR, R.J.; High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v.49, p.853–860, 2003.

WOOD DE, SALZBERG SL: **Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments**. *Genome Biology* 2014, 15:R46.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.21, n.1, p.75-98, 1991.

WU T. D.; WATANABE C. K. GMAP: A genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics*, 9(21):1859–1875, 2005. 117.

XU B, LIU L, HUANG X, MA H, ZHANG Y, DU Y, WANG P, TANG X, WANG H, KANG K, ZHANG S, ZHAO G, WU W, YANG Y, CHEN H, MU F, CHEN W. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. *PLoS Pathog.*; 7:e1002369. 2011.

YIN-CHIACHUN; LIU-HUNGJEN; LIN-SUENCHUAIN; LIAO-MINGHUEI; WUYEONGHUEY. Identification of *Ehrlichia canis* in cats by nested polymerase chain reaction and nucleotide sequence analysis. *Taiwan Veterinary Journal*, Taipei, v.29, n.2, p.122-128, 2003.

YU, J.; PRESSOIR, G.; BRIGGS, W.H.; VROH, B.I.I.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY J.F.; MCMULLEN, M.D.; GAUT, B.S.; NIELSEN D.M.; HOLLAND J.B. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet*, v.38, p.203–208, 2006.

Capítulo 1

Avaliação do perfil hematológico de duas populações de gatos (abrigos e domiciliados) do estado do Rio de Janeiro

1. Introdução

A população de gatos domésticos no Brasil cresce a cada ano, inclusive mais rapidamente que a de cães. Isto se deve à tendência atual de moradias verticais, habitações menores e novos estilos de vida compatíveis com as características de felinos domésticos que se adaptam bem a apartamentos, não necessitam passear com o dono e são silenciosos. Acrescenta-se a isso o crescimento do mercado brasileiro de produtos e medicamentos desenvolvidos especialmente para estes animais domésticos, que movimentam milhões de reais por ano e gera renda para várias famílias.

No Brasil, 17,7% dos domicílios possuem pelo menos um gato, o equivalente a 11,5 milhões de unidades domiciliares. A população de gatos em domicílios brasileiros foi estimada em 22,1 milhões, o que representa aproximadamente 1,9 gato por domicílio com animal (PNS, 2013). Segundo Almeida, Paixão e Labarthe (2005), estima-se que nos Estados Unidos da América existam aproximadamente 105 milhões de gatos, sendo 75 milhões domésticos e 30 milhões livres. No Brasil, a Organização Mundial de Saúde estima que há 30 milhões de animais abandonados, sendo 20 milhões de cães e 10 milhões de gatos.

O aumento da população felina domesticada também favorece o aumento da população errante, visto que os animais encontrados nas ruas provavelmente nasceram em um lar e foram abandonados. Existem medidas para conter o crescimento da população de rua, mas estas são ineficazes, uma vez que o crescimento populacional é maior que a taxa de controle (VIEIRA et al., 2006). Os locais onde se abrigam animais errantes, apesar dos cuidados, geram estresse aos animais, devido à falência de adaptação, superpopulação e doenças, causando uma diminuição do bem-estar (BROOM et al., 2004).

Na rotina clínica, o hemograma constitui um dos exames mais solicitados, não somente devido à abrangência dos parâmetros relacionados, mas também devido à sua praticidade e baixo custo. O hemograma, de modo isolado, é um recurso de diagnóstico limitado na maioria dos casos, mas é possível estabelecer um ponto de partida para o diagnóstico rápido e preciso do paciente. Através desse exame, o médico veterinário obtém informações sobre o estado clínico geral do animal, situações deficitárias (anemias), policitemia, processos infecciosos bacterianos, virais ou parasitológicos, alterações plaquetárias, neoplasias, doenças degenerativas, entre outros, até mesmo em pacientes assintomáticos (GONZÁLEZ; FÉLIX; SANTOS, 2005; GONZÁLEZ; SILVA, 2006; ZAVALA, 2007). Desta forma, o hemograma constitui-se como uma ferramenta norteadora para o diagnóstico e avaliação de doenças hematológicas, detecção de quadros infecciosos e monitoramento terapêutico (TESSER et al., 2016; THRALL et al., 2006).

Diversos fatores podem influenciar a interpretação dos resultados e deve-se considerar variações que ocorrem de acordo com a raça, idade, alimentação, manejo, condições geográficas e habitacionais, e estado fisiológico (lactação, gestação, estado reprodutivo) do animal (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2003). Além disso, é fundamental utilizar valores de referência apropriados para cada população de animais (BOURGÈS-ABELLA et al., 2015). Entretanto, sabe-se que a maioria dos valores de referência encontram-se na literatura

estrangeira (GONZÁLEZ et al., 2001; ZAVALA, 2007) e costumam ser usados referente a grupos de animais similares, dificultando a exatidão nas interpretações (TRUMEL et al., 2016).

Considerando-se que no Brasil, a literatura acerca do perfil hematológico de populações distintas de gatos domésticos é escassa, o presente estudo objetivou avaliar e comparar o padrão hematológico de gatos de abrigos e domiciliados da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, buscando identificar as alterações hematológicas e fatores associados.

2. Material e Métodos

No período de 2013 a 2015, foram coletadas amostras de sangue e realização de esfregaço sanguíneo à fresco de 105 gatos domésticos de abrigo (população 1), provenientes de 9 abrigos localizados nas cidades de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Seropédica, Itaguaí e Belford Roxo (Tabela 1). Os animais compreenderam 55 fêmeas e 50 machos, com idade de 1 mês a 9 anos, sendo apenas um da raça Siamês e os demais sem raça definida. Paralelamente, foram coletadas amostras de 178 gatos submetidos à atendimento clínico em clínica veterinária especializada (população 2), sendo 77 fêmeas e 101 machos, com idade de 1 mês a 19 anos, das raças Persa (19), Siamês (11), British shorthair (4), Himalaio (2), Azul da Rússia (1), Exótico de pêlo curto (1), Ragdoll (1), Maine Coon (1) e sem raça definida (138) (Tabela 4). O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ, sob o processo 23083004088/2013-94.

Os animais eram provenientes de diversos Bairros do município do Rio de Janeiro, também de Niterói, Petrópolis, Miguel Pereira, Nilópolis, Nova Iguaçu e São João de Meriti (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos animais de abrigos e domiciliados entre os municípios do estado do Rio de Janeiro.

Abrigos			Domiciliados		
Gatil	Localização	n	Município	n	
1	Duque de Caxias	7	Miguel Pereira	1	
2	Rio de Janeiro	10	Nilópolis	1	
3	Seropédica	6	Niterói	1	
4	Rio de Janeiro	28	Nova Iguaçu	1	
5	Rio de Janeiro	15	Petrópolis	1	
6	Itaguaí	11	São João de Meriti	1	
8	Seropédica	12	Rio de Janeiro	Zona Norte	48
9	Seropédica	9		Zona Oeste	16
				Zona Sul	105
				Zona Central	3

Previamente a coleta das amostras, os proprietários ou representantes do abrigo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), no qual foi esclarecido o objetivo e a importância do estudo. Também, responderam um questionário com questões

referentes ao animal, sendo: Nome, sexo, idade, padrão racial, se foi submetido à cirurgia de castração e local de moradia.

Em relação aos abrigos, foram coletadas amostras de sangue de aproximadamente 30% dos animais presentes no local, escolhidos por casualidade. Para os felinos domiciliados, foram coletadas amostras ao acaso durante atendimento clínico veterinário (Tabela 1.).

De cada animal foram coletadas amostras de sangue em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), através de venopunção cefálica ou jugular. A análise hematológica foi realizada em aparelho automatizado *Poch 100 iv Diff* (Sysmex), no qual foram determinados contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), determinação de hemoglobina (g/dL), volume globular (%), Volume Corpuscular Médio (VCM) (fL) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (%). A proteína plasmática total foi aferida por refratometria. A morfologia eritrocitária e leucometria específica foram avaliadas em esfregaço sanguíneo corado com corante instantâneo Panótico rápido® com auxílio de microscópio óptico, objetiva de imersão 1000x (JAIN, 1993). A pesquisa de hemoparasitas foi realizada sob microscopia de imersão (x100) nas lâminas coradas, observando em média 20 campos.

Os valores de referências utilizados como base para interpretação das alterações dos exames foram descritos por Schalm's et al., (2010). Os dados hematológicos para as duas populações foram apresentados em valores mínimos e máximos, média aritmética, desvio padrão e erro padrão e foram submetidos a análise de variância e comparados através do teste F, em nível de 5% de significância, quando estes apresentaram distribuição normal. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Mann-Whitney em nível de 5% de significância, para efeito de comparação destes parâmetros entre os dois grupos de animais. Também foi avaliada a frequência das alterações hematológicas mais significativas em cada população (anemia, desvio à esquerda regenerativo – DER, eosinofilia, hiperproteinemia, leucocitose, leucopenia, linfocitose, linfopenia, monocitose, neutrofilia e trombocitopenia).

A análise estatística foi realizada tendo cada animal como uma unidade de análise, e os fatores associados à cada população foram identificados por tabelas de associação para valores independentes, sendo $p < 0.05$ considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 5.3 (AYRES, 2000).

3. Resultados

Os resultados obtidos para os parâmetros relacionados ao eritrograma, leucograma, plaquetograma e proteína plasmática total das duas populações de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritograma, leucograma, plaquetometria e proteína plasmática total de duas populações de felinos domésticos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro hematológico	População 1					População 2					Valor de Referência **
	Média Aritmética*	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	Média Aritmética*	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	
Hematócrito (%)	35.81 ^a	6.93	0.68	16.00	54.00	34.55 ^a	6.79	0.51	17.00	53.00	24-45
Hemácias (10 ⁶ cels/ μ l)	8.11 ^a	1.52	0.15	3.60	11.90	6.76 ^b	1.41	0.11	3.00	10.00	5.0-10.0
Hemoglobina (g/dl)	10.82 ^a	2.16	0.21	5.00	15.00	11.02 ^a	2.41	0.18	1.00	17.00	8.0-15.0
VGM (fentolitros)	44.24 ^a	4.38	0.43	37.00	63.00	49.04 ^b	3.04	0.23	31.00	57.00	39-55
CHGM (%)	30.77 ^a	2.04	0.20	24.00	34.00	31.90 ^b	2.40	0.18	4.00	35.00	31-35
Leucócitos totais (μ l)	17021.90 ^a	8634.85	842.67	4200.00	60300.00	11376.40 ^b	7640.06	572.65	1700.00	61800.00	5500-19500
Bastões	235.53 ^a	450.47	43.96	0.00	3618.00	175.64 ^b	1026.29	76.92	0.00	9641.00	0-300
Segmentados	10631.44 ^a	7302.06	712.61	2385.00	46431.00	8400.68 ^b	5911.08	443.05	1100.00	32580.00	2500-12500
Linfócitos	4342.21 ^a	2693.69	262.88	420.00	14750.00	1974.36 ^b	3439.28	257.78	0.00	42024.00	1500-7000
Monócitos	506.38 ^a	503.48	49.13	0.00	3015.00	294.57 ^b	365.76	27.41	0.00	2023.00	100-1300
Eosinófilos	1297.34 ^a	1577.09	153.91	0.00	13536.00	527.41 ^b	667.49	50.03	0.00	4433.00	0-850
Basófilos	0.00 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00	3.44 ^a	23.99	1.80	0.00	199.00	0-150
Proteínas (g/dl)	7.87 ^a	1.19	0.12	6.00	12.00	7.44 ^b	1.11	0.08	0.00	12.00	5.5-7.5
Plaquetas (cels/ μ l)	277976.19 ^a	140429.88	13704.55	12800.00	920000.00	347977.53 ^b	59786.43	4481.18	110000.00	700000.00	300000-900000

*aValores seguidos de mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente através do teste ANOVA a 5% de significância (p<0,05) ou teste de Mann-Whitney a 5% de significância (p<0,05). **Valores de referência segundo Schalm's (2010).

Avaliando a frequência das alterações hematológicas (Tabela 3) nos dois grupos estudados, a hiperproteinemia foi a alteração que mais ocorreu em ambas as populações. Na população 1 eosinofilia e trombocitopenia foram bastante frequentes, enquanto que linfopenia foi uma alteração marcante na população 2.

Tabela 3. Principais achados hematológicos nas duas populações de felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração Hematológica	População 1		População 2	
	N	%	n	%
Anemia	5	4.76	13	7.30
Desvio Nuclear Neutrófilico à Esquerda	21	20.00	13	7.30
Eosinofilia	58	55.24	36	20.22
Hiperproteinemia	73	69.52	121	67.98
Leucocitose	21	20.00	21	11.80
Leucopenia	3	2.86	24	13.48
Linfocitose	12	11.43	3	1.69
Linfopenia	8	7.62	105	58.99
Monocitose	5	4.76	4	2.25
Neutrofilia	28	26.67	34	19.10
Trombocitopenia	67	63.81	43	24.16

A população 1, composta por animais de abrigos, apresentou média aritmética de Hemácias, Hematócrito, Hemoglobina e VGM dentro valor de referência descrito para a espécie (SCHALM's 2010). O valor de CHGM foi discretamente abaixo da referência (30.77 ± 0.20). Com relação ao leucograma, houve Eosinofilia (1297.34 ± 153.91). Os demais parâmetros avaliados (leucócitos totais, bastões, segmentados, linfócitos, monócitos e basófilos) apresentaram-se dentro dos valores de referência para a espécie. Proteína plasmática total (7.87 ± 1.19) foi superior ao intervalo de referência, caracterizando hiperproteinemia, enquanto o valor médio de plaquetas (277976.19 ± 13704.55) revelou trombocitopenia ou plaquetopenia.

As alterações morfológicas celulares, encontradas apenas na população 1, foram neutrófilos tóxicos e macroplaquetas. Três animais apresentaram inclusões em hemácias sugestivas de *Mycoplasma* spp.

Por sua vez, na população 2, composta por animais atendidos em clínica veterinária especializada, todas as médias aritméticas dos parâmetros avaliados apresentaram-se dentro do limite de referência descrito para a espécie (SCHALM's 2010). Não foram observadas alterações morfológicas ou inclusões sugestivas de parasitos.

Foram observadas diferença significativas ($p < 0.05$) em todos os parâmetros hematológicos avaliados entre as duas populações de gatos, exceto Hematócrito, Hemoglobina e Basófilos (Tabela 2).

Os dados referentes aos fatores associados (sexo, raça, idade e castração) das duas populações, representados por frequência, estão na tabela 4.

Tabela 4. Fatores associados (sexo, raça, idade e castração) de gatos domésticos de duas populações da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Variável	População 1		População 2		
	n	%	n	%	
Sexo	Macho	50	47.62	99	55.62
	Fêmea	55	52.38	79	44.38
Raça	Sim	1	0.95	40	22.5
	SRD	104	99.05	138	77.5
Idade (meses)	0 a 6	23	21.90	20	11.24
	7 a 60	42	40.00	57	32.02
	>60	40	38.10	101	56.74
Castrado	Sim	56	53.33	129	72.47
	Não	49	46.67	49	27.53

4. Discussão

No Brasil, há um crescente aumento da preocupação com a saúde e o bem estar animal, de modo que a realização de exames laboratoriais complementares estão se tornando cada vez mais frequentes. No entanto, existe atualmente uma lacuna sobre o perfil hematológico de populações distintas de gatos domésticos (abrigos x domiciliados), que podem, em conjunto com o histórico e exame clínico, auxiliar na identificação ou classificação de estados patológicos em mamíferos domésticos (STOCKHAM; SCOTT 2011).

Os resultados demonstraram que diversos parâmetros (CHGM, hemácias, eosinófilos, proteínas, plaquetas) da população 1 (gatos de abrigos) apresentaram-se fora dos valores de referência, diferente do observado para a população 2, composta por gatos atendidos na clínica veterinária. Tais alterações provavelmente estão associadas ao fato do abrigo de animais ter diversos desafios, dentre os quais destacam-se recursos financeiros limitados, instalações muitas vezes insuficientes, grande rotatividade de cuidadores e de animais. Acrescenta-se a isso, que os gatos são altamente suscetíveis aos efeitos de um ambiente estressante e lotado, sendo para os tutores e os veterinários responsáveis, uma tarefa árdua gerir as doenças infecciosas e parasitárias neste ambiente (HURLEY, 2005). Por outro lado, os animais provenientes de clínicas veterinárias tendem a ter acesso a maiores cuidados, melhor alimentação e assistência médica-veterinária.

As alterações evidenciadas em cada parâmetro analisado neste estudo, podem ser relacionadas com um grupo de causas, auxiliando assim, o médico veterinário na avaliação clínica do paciente. O eritrograma leva à caracterização das anemias, porém também sofre discreta variação com a idade do animal (TESSER et al., 2016). Anemia foi observada em 4.6% dos animais da população 1 e 7.3 % dos animais da população 2 (Tabela 3).

O leucograma, por sua vez, permite um direcionamento para determinada enfermidade, seja infecciosa, inflamatória, neoplásica, dentre outras. A população 1 composta por gatos de abrigos domésticos apresentou eosinofilia, diferentemente do observado para a população 2. Inúmeras causas podem estar associadas à essa alteração hematológica, dentre as quais, cita-se

intensa infestação por pulgas, carrapatos e possivelmente por helmintos (THRALL et al., 2015), já que nem todos os abrigos vermifugavam os animais ou faziam controle de ectoparasitas.

Diversas são as causas de hiperproteinemia, a qual foi evidenciada na média aritmética dos animais da população 1: desidratação/hemoconcentração, aumento da síntese proteica, inflamação, infecção (viral, bacteriana, protozoária e fúngica), efeitos imuno-mediados, neoplasia, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade (WATTERSON et al., 2009), todas possíveis de acontecer em animais de abrigo.

A trombocitopenia observada na população 1, pode estar relacionada a infecções ou ainda neoplasias. É digno de nota, que em felinos é comum a presença de agregados plaquetários determinando uma pseudotrombocitopenia, muitas vezes devido a falhas na coleta causada principalmente pela agitação do animal (STOCKHAM; SCOTT 2011).

Ambientes estressantes, medo e excitação associados à punção venosa do animal, frequentemente determinam alterações no hemograma devido ao efeito das catecolaminas. No caso do estresse agudo, podem ser observados leucocitose, neutrofilia e linfocitose. (VALENCIANO et al., 2010). No estresse crônico, causado por estímulos prolongados, como casos de dor persistente ou ambientes estressantes, através da ação do Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e liberação de cortisol, espera-se encontrar o leucograma de estresse, caracterizado por leucocitose, neutrofilia, eosinopenia e linfopenia (FAM et al., 2010). Leucograma de estresse foi observado pontualmente em alguns animais, sem alterar a média da população geral. Na população 2 houve maior frequência de linfopenia (Tabela 3), esta pode estar relacionada a casos de estresse crônico, mas também a outras doenças que causam linfopenia, como FeLV (ALMEIDA et al., 2016). Segundo Greco (2007), a linfopenia é a alteração mais consistente após a liberação de glicocorticoides. Na população 1 havia maior frequência de animais jovens (Tabela 4). De acordo com e Cowell e Decker (2000), animais jovens respondem à adrenalina mais intensamente do que adultos, o que justifica a ocorrência de leucograma de estresse em alguns animais menores de 6 meses.

É digno de nota, que as alterações evidenciadas, também podem estar associadas a outras causas que não patológicas. Idade, sexo, raça, estado nutricional, bem como gestação, lactação ou tratamento farmacológico podem afetar os valores hematológicos aferidos. Os efeitos da maioria destes fatores sobre os valores hematológicos não são peculiares ao gato, mas são comuns para todas espécies domésticas (SCHALM's 2010).

Os dados hematológicos são de grande valia para avaliar e acompanhar o estado de saúde dos gatos. Populações de gatos domiciliados e errantes diferiram entre si, mostrando que condições de manejo e moradia podem influenciar nos valores hematológicos. Fatores como raça, faixa etária, região e informações sobre as condições de vida do animal são importantes na análise clínica e se fazem necessários na determinação de valores de referências próprios para cada raça. Por isso, estudos futuros abrangendo tais parâmetros auxiliariam em uma adequada interpretação dos resultados e um diagnóstico fidedigno.

5. Referência Bibliográfica

ALMEIDA NR, SOARES LC, WARDINI AB. Alterações clínicas e hematológicas em gatos domésticos naturalmente infectados pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV). **Revista de Saúde**. Jan./Jun., v.07, n.1, p.27-32, 2016.

ALMEIDA, F.M.; PAIXAO, R. L.; LABARTHE, N. V. Superpopulação de gatos domésticos (*Felis catus* Linnaeus, 1758) urbanos – compreender para controlar. **Clínica Veterinária**, ano X, n.58, p.44-48, 2005.

AYRES, M. **BioEstat 2.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2000. 272 p.

BOURGÈS-ABELLA, N. H.; GURY, T.D.; GEFFRÉ A.; CONCORDET, D.; THIBAUT-DUPREY, K.C.; DAUCHY, A.; TRUMEL, C. Reference intervals, intraindividual and interindividual variability, and reference change values for hematologic variables in laboratory beagles. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.54, n.1, p.17-24, 2015.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem estar animal: Conceito e questões relacionadas – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n.2, p.1-11, 2004.

COWELL, R. L.; DECKER, L. S. Interpretation of feline leukocyte responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (eds). **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 382-90.

FAM, A. L. P. D.; ROCHA, R. M. V. M.; PIMPÃO, R. C. T.; CRUZ, M. A. Alterações no leucograma de felinos domésticos (*Felis catus*) decorrentes de estresse agudo e crônico. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 299-306, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D. et al. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.29, p. 1-6, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SANTOS, A. P. Patologia clínica veterinária. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2005, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2005, p.91.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. Perfil Sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 73-89.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução a bioquímica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

GRECO, D. S. Avaliação laboratorial das glândulas tireóide, paratireóide, adrenal e pituitária. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 416-430.

HURLEY, K. F. Feline infectious disease control in shelters, **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** , v.35, n.1, p.21–37, 2005.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, 417p., 1993.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE: 2013 : acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências : Brasil, grandes regiões e unidades da federação / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. – Rio de Janeiro : IBGE, 2015.100 p

SCHALM, O. W. **Veterinary hematology**. 6ª edição, Wiley-Blackwell, 2010.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2ª edição Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 2011, 729p.

TESSER, S.; CAVAGNOLLI, N. I.; TORRIANI, T.; RODRIGUES, A. D. Perfil hematológico de cães e gatos na cidade de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v.19, n.1, p.47-51, 2016.

THRALL M.A., BAKER D.C., CAMPBELL T.W., DENICOLA D., FETTMAN M.J., LASSEN E.D., REBAR A. & WEISER G.. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. 582 p.

THRALL, M.A.; WEISER, G. ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica - Clínica Veterinária** -Roca, Brasil, 2ª Ed. 2015.

TRUMEL, C., MONZALI, C., GEFFRÉ, A., CONCORDET, D. V., HOURQUEIG, L., BRAUN, J.P. D., BOURGÈS-ABELLA, N. H. **Hematologic and Biochemical Biologic Variation in Laboratory Cats Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.55, n.5, p.503-509, 2016.

VALENCIANO, A.C., DECKER, L.S. & COWELL, R.L. (2010). Interpretation of feline leukocyte responses. In D.J. Weiss & K.J. Wardrop, **Schalm's Veterinary haematology**. (6th ed.). (pp. 335-344). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell

VIEIRA, A. M.; ALMEIDA, A. B.; MAGNABOSCO, C.; FERREIRA, J. C. P.; LUNA, S. L. P.; CARVALHO, J. L. B.; GOMES, L. H.; PARANHOS, N. T.; REICHMANN, M. L.; GARCIA, R. C.; NUNES, V. F. P.; CABRAL, V. B. Programa de controle de populações de cães e gatos do estado de São Paulo, São Paulo. **BePA Boletim Epidemiológico Paulista**, v.3, n.33, p.1-139, 2006

WATTERSON C.L.; Proteins. *In*: G.O. EVANS. **Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers**. 2nd ed. 2009; p159-181.

ZAVALA, M.V. G. Aspectos clínicos e laboratoriais de cães suspeitos de infecções causadas por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ. 2007. **Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, Campos dos Goytacazes, 2007.

Capítulo 2

First detection of *Ehrlichia chaffeensis* in a cat from Rio de Janeiro, Brazil

1. Introduction

Ehrlichiosis is a tick-borne disease. The agent is a Gram-negative obligatory intracellular bacterium with a tropism for monocytes and macrophages. Feline ehrlichiosis is transmitted by vectors, especially ticks. However, it is not known for sure which are the vectors in Brazil and transmission routes of natural infection is likely to hinder participation of *Rhipicephalus sanguineus* as well as in canine ehrlichiosis (LITTLE, 2010; DRYDEN & PAYNE, 2004). However, cats residing in homes with established populations of *R. sanguineus* may be at higher risk of infection (LITTLE, 2010).

Occurrence of feline ehrlichiosis in the world varies widely according to the region studied and the technique used for diagnosis. In Brazil, 20% (3/15) of sampled cats in Viçosa-MG were positive by Polymerase Chain Reaction (PCR), with sequence of *E. canis* obtained in the same region affected dogs, suggesting the possibility of a single strain of *E. canis* infecting dogs and cats in Brazil (OLIVEIRA et al., 2009). In São Luís - MA only Two cats (1%) were positive by PCR for *Ehrlichia* sp. based on 16S *rRNA* gene, being one sample positive for *E. canis* and another for *E. chaffeensis* in nested-PCR, but both samples were negative by Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) (BRAGA et al., 2012). In Spain, among 235 cats evaluated, 17.4% of stray cats and 18.4 % of pet cats were positive for *Ehrlichia* sp. by IFAT (ORTUÑO et al., 2005). On the other hand, in Barcelona, Tabar et al. (2008) found only one animal positive by PCR for *Ehrlichia/Anaplasma* genera in 100 cats studied.

Clinical signs usually described in canine ehrlichiosis are fever, depression, anorexia, weight loss, hemorrhages, epistaxis, gastrointestinal signs like vomiting or diarrhea, respiratory disorders and ocular signs. Laboratory findings most frequently determined are thrombocytopenia, leukopenia, anemia and hypergammaglobulinemia (Woody and Hoskins, 1991). Hematological alterations such as low erythrocyte count, thrombocytopenia, lymphopenia and monocytosis were observed in *E. canis* PCR positive cats (Braga et al., 2013).

The aim of the present study was to describe the first case of a cat naturally positive for *E. chaffeensis* by molecular methods in Rio de Janeiro, and to evaluate the hematologic changes associated with this infection.

2. Material and methods

In the period from 2013 to 2015, blood samples were collected from 105 shelter domestic cats (population 1) distributed through 9 shelters located in the cities of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Seropédica, Itaguaí and Belford Roxo. At the same time, samples were collected from 178 cats submitted to clinical care at a specialized veterinary clinic (population 2).

This study was approved (Process 23083004088/2013-94) by the Ethics Committee in Research of Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). At time of blood collection, information related to sampled animals (gender, breed and age) was recorded, aiming to evaluate possible associations with positivity for *Ehrlichia* spp. From each animal, blood samples were collected in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulant through cephalic or jugular venipuncture.

EDTA-blood samples were used in hematological analyses using Poch-100iv (Roche, USA) and Diff Quick (Laborclin) stained-blood. Aliquots of blood sample were stored at -80°C for use in molecular assays.

DNA was extracted from each 200 µL of EDTA-whole blood samples using ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega™, Madison, Wisconsin, United States) according to manufacturer's instructions. Ultra-pure sterile water (Invitrogen™, Carlsbad, California, United States) was used as negative control in each battery samples for monitoring contaminant DNA during total DNA extraction process. Concentration of extracted DNA samples was determined by NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) spectrophotometer. DNA samples were separated into aliquots and stored at -80°C until time of molecular assays.

Each extracted DNA sample was used as a template in a 25 µL nested PCR reaction mixture containing 10X PCR buffer, 1.0 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) mixture, 1.5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), and 0,5 µM of *Ehrlichia* spp. genus primers ECC and ECB in first reaction, and ECAN-5 and HE-3 in second reaction (MURPHY et al., 1998) for *E. canis*, based on sequence of the 16S rRNA gene. *Ehrlichia canis* positive control DNA sample was obtained from an experimentally-infected dog with Jaboticabal strain-*E. canis* (CASTRO et al., 2004).

To detect *E. chaffeensis* based on sequence of the 16S rRNA gene, reactions with ECC and ECB primers were performed as in previous test. The second reaction was used primers GAIUR and CHAFF (PERSING, 1996; KOCAN et al., 2000).

Anaplasma was detected by a nested PCR targeting part of the 16S rRNA gene when first reaction was with gE3a and gE10R primers and the second with gE2 and gE9F (MASSUNG et al., 1998).

Positive control samples to *E. chaffeensis* and *Anaplasma* spp. were donated by Immunoparasitology laboratory team at FCAV - UNESP Jaboticabal. To prevent PCR contamination, DNA extraction, reaction setup, PCR amplification and electrophoresis were performed in separated rooms.

All reaction products were purified using Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega™, Madison, Wisconsin, United States).

Purified amplified DNA fragments were submitted for sequence confirmation in an automatic sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser Applied Biosystem/ Perkin Elmer) and used for subsequent phylogenetic analysis. Comparisons with sequences deposited in GenBank were done using the basic local alignment search tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

3. Results

Only one (0,56%) cat of population 2, attended at a specialized veterinary clinic, was positive for *Ehrlichia chaffeensis*. The animal was a male, neutered, undefined breed, 16 years old, resident in Ramos neighborhood, Rio de Janeiro city. Fleas were observed at sampling time, but no ticks. During clinical examination it presented a heart rate of 200 beats per minute, pulmonary auscultation without changes, body temperature of 38.8 C and reduced skin turgor. Owner reported anorexia and vomiting. Animal had a previous history of Feline viral respiratory complex. Hemogram showed no alterations, with all parameters within the reference limits (SCHALM's 2010).

Amplified product (a 410bp fragment of 16S rRNA gene) were purified and submitted to sequencing. The partial sequence showed 100% of identity to isolates of *Ehrlichia chaffeensis* by BLAST analysis.

4. Discussion

In Brazil, antibodies anti-*Ehrlichia chaffeensis* were detected in serum samples from dogs and humans in Minas Gerais state (COSTA et al., 2006), emphasizing the importance of this agent as cause of zoonotic disease. It also was detected by molecular methods in samples of Pantanal deer (*Blastocerus dichotomus*) (MACHADO et al., 2006). The present study, consists in the first molecular detection of *Ehrlichia* genus and *E. chaffeensis* in cats from Rio de Janeiro, Brazil and brings rise to further studies considering zoonotic agents transmitted by cats.

There are few studies investigating *Ehrlichia* in felines. André et al. (2010) observed *E. canis* DNA in 11 wild felines from zoos of São Paulo and Brasília. In 2009, in the state of Minas Gerais, was the first molecular detection of *E. canis* in 3 of 15 cats studied (Oliveira et al., 2009). In Cuiabá-MT, eight (8.6%) cats tested positive by PCR with 100% match to *E. canis* and 42 (45.1%) cats showed antibody reactivity against *Ehrlichia* spp. (BRAGA et al., 2013). In São Luis-MA, 11 cats (5.5%) were seropositive for *Ehrlichia* sp. and two (1%) were positive for *Ehrlichia* sp. in PCR, one cat presented 98% identity with *E. canis*, and another cat showed 97% identity with *E. chaffeensis* (BRAGA et al., 2012).

In all studies of molecular detection of *Ehrlichia* in brazilian cats frequency of positive animals remains low, suggesting circulation of this agent in Brazil, but to a lesser extent than in dogs.

Clinical signs and laboratory determinations of felines infected with *Ehrlichia* sp. are variable and include fever, apathy, anorexia, mucosal pallor, lymphadenomegaly, splenomegaly, anemia, thrombocytopenia, leukopenia, increased serum aminotransferase activity and alkaline phosphatase and hyperglobulinemia (ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY, MASSARD, 1999; STUBBS et al., 2000). Hematological alterations such as low erythrocyte count, thrombocytopenia, lymphopenia and monocytosis were observed in *E. canis* PCR positive cats (BRAGA et al., 2013). However, the studied animal did not show hematological alterations. At sampling time, clinical changes observed were dehydration and apathy. The history of vomiting, anorexia and Feline viral respiratory complex may have assisted immunosuppression, leading to a greater parasitemia and the diagnosis of hemoparasitosis. However, further studies are needed to prove this possibility.

The positive cat is a male, elderly, neutered, undefined breed. Previous studies have shown no correlation between age and sex, suggesting that infection in cats does not have well established associated factors (BRAGA et al., 2013).

Vector of canine ehrlichiosis is *Rhipicephalus sanguineus*, but has been proven experimentally that *Dermacentor* sp. can also transmit *E. canis* (JOHNSON et al., 1998) and readily feed on cats (JOHNSON et al., 1998; LITTLE, 2010). Adult *Amblyomma americanum* also are commonly found on cats, but reports of molecular evidence of infection with *E. chaffeensis* or *E. ewingii* in cats are lacking. *Ixodes scapularis* readily feeds on cats as both a nymph and adult (DRYDEN & PAYNE, 2004; LITTLE, 2010). On the other hand, it is still not known which vector arthropod is responsible for transmission of feline erlichiosis and transmission routes on natural infection are uncertain, and it is probable that the exposure to arthropods and rodent ingestion are the main causes of feline infection (BEAUFILS et al., 1999; LAPPIN, 2001). The cat had fleas at sampling time, but no ticks and, unfortunately, fleas were not collected for molecular testing.

Information related to geographical distribution, pathological findings and zoonotic potential of feline ehrlichiosis has expanded in recent years. Identification of species that affect domestic animals, especially domestic cats, is important for development of control measures

for this disease, either in animals or in humans, due to close interaction between them. Combination of diagnostic techniques in the identification should be employed to further characterize infection by these agents.

Ehrlichia chaffeensis circulates in cat population of Rio de Janeiro. Further studies are needed to characterize vectors, transmission routes and pathogenesis in cats infection.

5. References

ALMOSNY N.R.P. & MASSARD C.L. 1999. **Erliquiose felina: revisão**. *Clín. Vet.* 4(23):30-32.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J., 1990. **Basic local alignment search tool**. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

ANDRÉ M.R. 2008. Detecção molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em felídeos silvestres brasileiros mantidos em cativeiro. **Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Unesp, Campus de Jaboticabal, São Paulo. 78p.

ANDRÉ, M.R., ADANIA, C.H., MACHADO, R.Z., ALLEGRETI, S.M., FELIPPE, P.A.N., SILVA, K.F., NAKAGHI, A. C. H. Molecular detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.46, p.1017 - 1023, 2010.

BEAUFILS, J. P.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.; BARBAULT-JUMELLE, M. Ehrlichiose probable chez le chat: etude retrospective sur 21 cas. **Pratique Médecine Chir Animal Compagnie**, n.34, p.587-596, 1999.

BRAGA I.A.; SANTOS L.G.F.; MELO A.L.T.; JAUNE F.W.; ZILIANI T.F.; GIRARDI A.F.; AGUIAR D.M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 22, n. 4, p. 470-474, out.-dez. 2013.

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

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

COSTA, P.S.G.; VALLE, L.M.C.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. More about Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of new nine cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.10, n.1, p.7-10, 2006.

DRYDEN MW, PAYNE PA. Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. **Vet Ther** 2004;5(2):139–54.

JOHNSON EM, EWING SA, BARKER RW, et al. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitol** 1998;74(2-4):277-88.

KOCAN, A.A.; LEVESQUE, G.C.; WHITWORTH, L.C.; MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; BARKER, R.W. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.6, n.5, p.477-480, 2000.

LAPPIN, M. R. Feline ehrlichiosis and hemobartonellosis. In: **World Small Animal Veterinary Association World Congress**. Anais.Vancouver, 2001.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. **Vet.Clin.Small Anim.** v.40, p.1121-1141, 2010.

MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.B.; DAGNONE, A.S.; SZABÓ, M.P.J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, n.1-3, p.262-266, 2006.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1090-1095, 1998.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n.4, p.325-339, 1998.

OLIVEIRA, L.S.; MOURÃO, L.C.; OLIVEIRA, K.A.; DA MATTA AGOSTINI, M.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE ALMEIDA, M.R.; FIETTO, J.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; FILHO, J.D.; GALVÃO, M.A.; MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, Supl.2, p.53-54, 2009.

ORTUÑO, A.; GAUSS, C.B.L.; GARCIA, F.; GUTIERREZ, J.F. Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from Northeastern Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.52, n.5, p.246-248, 2005.

PERSING, D.H. **PCR protocols for emerging infectious diseases. A supplement to iagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C.: ASM Press, 1996, 180 p.

STUBBS, C.J.; HOLLAND, C.J.; REIF, J.S.; WHEELER, S.; BRUNS, C.; LAPPIN, M.R. Feline ehrlichiosis. **The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarians**, Princeton, v.22, n.4, p.307-318, 2000.

TABAR M.D., Altet L., Francino O., Sanchez A. & Ferrer L. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). **Vet. Parasitol.** v.151. n.2/4, p.332-336. 2008.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.75-98, 1991.

Capítulo 3

A novel *Ehrlichia* sp. genotype in opossums (*Didelphis aurita*) in Brazil

1. Introduction

Diseases transmitted by arthropod vectors represent new challenges to human and veterinary medicine. These vectors are expanding their geographical distribution, mainly due to climate change and access to other ecological niches than usual. A large number of infectious agents, hosts and vectors are involved in the epidemiology of these diseases (HARRUS; BANETH, 2006).

Presence of domestic animals in wild environments has increased the translocation of arthropod-borne pathogens from wildlife reservoirs to humans and domestic animals (SHAW et al., 2001). Thus, characterization of infected reservoirs is a Public Health goal worldwide. Regarding zoonotic tick-borne pathogens, Anaplasmataceae agents comprises obligate intracellular, gram-negative and pleomorphic bacteria (DUMLER et al., 2001). Recently, new *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. genotypes have been described in wild animals in Brazil (ANDRÉ et al., 2010; 2012; SACCHI et al., 2012; MACHADO et al., 2012; WIDMER et al., 2011).

However, few are the studies regarding the occurrence of Anaplasmataceae agents in opossums. For instance, Lockhart et al. (1997) found 3 (8%) opossums (*Didelphis virginianus*) seropositive to *E. chaffeensis* in the state of Georgia, USA, with titres ranging from 64 to 512. Similarly, antibodies to *E. chaffeensis* were detected in 3 (15.8%) opossums sampled in the state of Mississippi, USA (CASTELLAW et al., 2011). Recently, antibodies to *Ehrlichia canis* have been detected in 16 (14.67%) opossums sampled in the state of São Paulo, southeastern Brazil (MELO et al., 2016).

The aim of the present study was to investigate the occurrence of Anaplasmataceae agents in opossums from the state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil, using molecular techniques. As well as, to describe the occurrence of a new strain of *E. canis* in a naturally infected opossum.

2. Materials and Methods

Between January 2014 and November 2014, 37 opossums (*Didelphis* sp.), selected by non-probability convenience, were sampled at Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) and Centro de Recuperação de Animais Silvestres da Universidade Estácio de Sá (CRAS), state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. This study was previously approved by the Ethical Committee on Animal Research (Sisbio, n. 47791), Brazil.

Blood samples were collected with anticoagulant (Ethylenediamine tetraacetic acid) by tail ventral surface venopuncture (Jurgelski Junior, 1974). Blood smears were immediately performed and the remaining blood was stored at -20°C until molecular analysis.

DNA was extracted from each 200 µL of EDTA-whole blood samples using ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega™, Madison, Wisconsin, United States), according to manufacturer's instructions. Ultra-pure sterile water (Invitrogen™, Carlsbad, California, United States) was used as negative control in each battery samples for monitoring contaminant DNA during process of total DNA extraction. The concentration of extracted DNA samples was determined by spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). DNA samples were separated into aliquots and stored at -80°C until time of molecular assays.

Each sample of extracted DNA was used as a template in 25µL reaction mixtures containing 10x PCR buffer, 1.0 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) mixture, 1.5U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) with 0.5 µM of genus and species-specific primers for *Ehrlichia canis* (MURPHY et al., 1998), *E. chaffeensis* (KOCAN et al., 2000), and *Anaplasma* spp. (MASSUNG et al., 1998) (*16S* rRNA gene) (Table 1). *E. canis* positive control DNA sample was obtained from experimentally-infected dogs with Jaboticabal strain of *E. canis* (CASTRO et al., 2004). *A. platys* DNA positive control was obtained from an *A. platys*-naturally infected dog from Campo Grande, MS (DAGNONE et al., 2009). *Ehrlichia chaffeensis* DNA positive control was kindly supplied by Prof. Dr. John Stephen Dumler (University of Maryland, Baltimore, MD, USA). Ultra-pure sterile water was used as negative control. In order to prevent PCR contamination, DNA extraction, reaction setup, PCR amplification and electrophoresis were performed in separated rooms. The reaction products were purified using Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas®, São Paulo, SP, Brazil). Purified amplified DNA fragments were submitted for sequence confirmation in an automatic sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser – Applied Biosystem/ Perkin Elmer) in Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (FCAV/ UNESP Jaboticabal, SP, Brazil) and used for subsequent phylogenetic analysis. Consensus sequences were obtained through sense and antisense sequences analyses using the CAP3 program (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>). Comparisons with sequences deposited in GenBank were done using basic local alignment search tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

Sequences were aligned with sequences published in GenBank using Clustal/W (Thompson et al., 1994) and manually adjusted in Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Phylogenetic inference based on maximum likelihood criterion (ML), was inferred with RAxML-HPC BlackBox 7.6.3 (STAMATAKIS et al., 2008) through the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). Akaike information criterion was used with software JModelTest on CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010) to identify most appropriate model of nucleotide substitution. The GTRGAMMA+I model was chosen as most appropriate for Maximum Likelihood analysis of the 16S rDNA alignment.

Table 1. Description of primers, PCR product size and references used in PCR assays for *E. canis*, *E. chaffeensis* and *Anaplasma* spp. based on 16S rRNA gene.

Agent and Primers	Oligonucleotide Sequence	Product PCR Size	References
<i>Ehrlichia</i> spp.			
- ECC	5'- GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3'	478	MURPHY et al., 1998
- ECB	5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3'		
Nested <i>E. canis</i>			
- ECAN-5	5'-CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA -3'	358	MURPHY et al., 1998
-HE3	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'		
Nested <i>E. chaffeensis</i>			
- CHAFF	5'- CAA TTGCTTATAACCTGGTTATAAAT-3'	410	KOCAN et al., 2000
-GAIUR	5'-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3'		
<i>Anaplasma</i> spp.			
-gE3a	5'- CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'	932	MASSUNG et al., 1998
-gE10R	5'- TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC'-3'		
Nested <i>Anaplasma</i> spp			
-gE2	5'- GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'	546	
-gE9f	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'		

3. Results

One (2.7%) out of 37 marsupials was positive for both *E. canis* and *E. chaffeensis* nested PCR assays based on 16S rRNA gene. The sequences showed 100% identicalness with *Ehrlichia canis* (GenBank access number KR920044.1) by BLAST analysis. The ML phylogenetic inference positioned found *Ehrlichia* sp. 16S rRNA gene fragment sequence near to *Ehrlichia canis* (Figure 1). This animal was a *Didelphis aurita* young female weighing 363g seized in Vargem Grande neighborhood, Rio de Janeiro, RJ on March 21, 2014. It was taken to CRAS for rehabilitation and subsequent habitat reintroduction. At time of blood sampling on March 31, 2014, marsupial did not show tick infestation.

During treatment, the animal was kept in cages, received water *ad libitum*, fruits and food. Support and management were performed by a practitioner, who was in charge in CRAS.

4. Discussion

There is a growing concern about participation of wild hosts and reservoirs in epidemiology of Anaplasmataceae agents, particularly within the context of increasingly environmental changes and expansion of the One Health concept. This study reports for the first time molecular detection of *Ehrlichia* in a naturally infected opossum (*Didelphis* spp.). These findings, indicate a possible role of wildlife in introduction and/or maintenance of natural foci of Ehrlichiosis transmission.

There are few studies about detection of *Ehrlichia* spp. in opossums, although these animals are infested with different species of ticks and can often act as amplifier hosts of some pathogens (HORTA et al., 2009). Antibodies anti-*Ehrlichia chaffeensis* have been reported in the United States (CASTELLAW et al., 2011). In Brazil, antibodies anti-*Ehrlichia* spp. have been reported in opossums of São Paulo and authors have suggested the possibility that an unrecognized ehrlichial agent is circulating among these animals due to the existence of cross-reactivity observed in the serological assays (HARRUS & WANER, 2011). Our results reinforce such findings and bring rise to discussion of opossums in epidemiology of the genus *Ehrlichia*.

The *Ehrlichia* sp. 16S rRNA sequence showed to be closely related to *E. canis*. Among wild animals, *Ehrlichia* spp. genotypes closely related to *E. canis* have been already reported in wild carnivores (ANDRÉ et al., 2010; 2012) and wild birds in Brazil (MACHADO et al., 2012). Although further molecular characterization based on other genes is desirable in order to assess phylogenetic positioning of *Ehrlichia* sp. circulating in marsupials in Brazil, the scarcity of DNA samples of sampled animals precluded this type of approach. Additional studies aiming at sampling a higher number of marsupials and molecular testing targeting different genes are needed in order to assess the role of these mammals in epidemiological cycles of ehrlichiosis in South America.

Although the opossums sampled in present study were not presenting ectoparasites at sampling time, there is a possibility that ectoparasites may have left the animal during ten days of captivity. Larva, nymph and adults of *Amblyomma* spp. and *Ixodes loricatus* ticks have been reported on opossums in São Paulo state, Brazil (HORTA et al., 2007). Additionally, *I. loricatus* and *A. aureolatum* have been detected on *Didelphis albiventris* in Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul states, Brazil, respectively (MIZIARA et al., 2008; MULLER et al., 2005).

In conclusion, a *Ehrlichia* sp. genotype closely related to *E. canis* circulate in opossums in Rio de Janeiro state, southeastern Brazil.

5. References

- ALTSCHUL, S.F. et al. (1990) Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 215, 403–410.
- ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; SILVA, K.F.; NAKAGHI, A.C.H. Molecular and Sorologic Detection of *Ehrlichia* spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v.46, n.3, p.1017-1023, 2010.
- ANDRÉ, M.R.; DUMLER, J.S.; SCORPIO, D.G.; TEIXEIRA, R.H.F.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Tick and Tick-borne Diseases**. v.3, p.247-253, 2012.
- CASTELLAW AH, CHENNEY EF, VARELA-STOKES AS. Tick-borne disease agents in various wildlife from Mississippi. **Vector Borne Zoonotic Dis**. 2011;11:439–42.
- CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; DE AQUINO, L.P.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.19, n.1, p.73-86, 2004.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, RZ. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.4, p.20-25, 2009.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., 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.

HALL T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98, 1999.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, v. 11-12, p. 1309-1318, 2006.

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

HORTA, M.C., LABRUNA, M.B., PINTER, A., LINARDI, P.M., SCHUMAKER, T.T.S. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 102 (7): 793-801, November, 2007.

HORTA, MC, MORAES-FILHO, J, CASAGRANDE, RA, SAITO, TB, et al. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector Borne Zoonot Dis** 2009; 9:109–117.

JURGELSKI JUNIOR, W. The opossum (*Didelphis virginiana* Kerr) as a biomedical model. I-Research perspective husbandry and laboratory techniques. **Laboratory Animals Science**, v.24, n.2, p.376-403, 1974.

KOCAN, A.A.; LEVESQUE, G.C.; WHITWORTH, L.C.; MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; BARKER, R.W. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.6, n.5, p.477-480, 2000.

LOCKHART J.M., DAVIDSON W.R., STALLKNECHT D.E., DAWSON J.E., LITTLE S.E. Natural History of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in the Piedmont Physiographic Province of Georgia, **The Journal of Parasitology**, Vol. 83, No. 5 (Oct., 1997), pp. 887-894

MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; SOUZA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JUNIOR, J.R.F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.8, p.705-708, 2012.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1090-1095, 1998.

MELO A.L.T.; AGUIAR D.M.; SPOLIDORIO M.G.; YOSHINARI N.; MATUSHIMA E.R.; LABRUNA M.B.; HORTA M.C. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of São Paulo, Brazil, **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 348-352, jul.-set. 2016.

MILLER MA, PFEIFFER W, SCHWARTZ T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, LA, 2010: 1–8. 2010.

MIZIARA, S.R., PAIVA, F., ANDREOTTI, R., KOLLER, W.W., LOPES, V.A., PONTES, N.T., BITTENCOURT, K. Ocorrência de *Ixodes loricatus* NEUMANN, 1899 (ACARI: IXODIDAE) parasitando *Didelphis albiventris* (LUND, 1841), (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE), em Campo Grande, MS **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.3, p.158-160, 2008.

MULLER, G., BRUM, J.G.W., LANGONE, P.Q., MICHELS, G.H., SINKOC, A.L., RUAS, J.L., BERNE, M.E.A. *Didelphis albiventris* LUND, 1841, parasitado por *Ixodes loricatus* NEUMANN, 1899, e *Amblyomma aureolatum* (PALLAS, 1772) (ACARI: IXODIDAE) NO Rio grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.319-324, jul./set., 2005.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n.4, p.325-339, 1998.

SACCHI A.B.V., DUARTE J.M.B., ANDRÉ M.R., MACHADO R.Z.. 2012. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 35:4, 325-334.

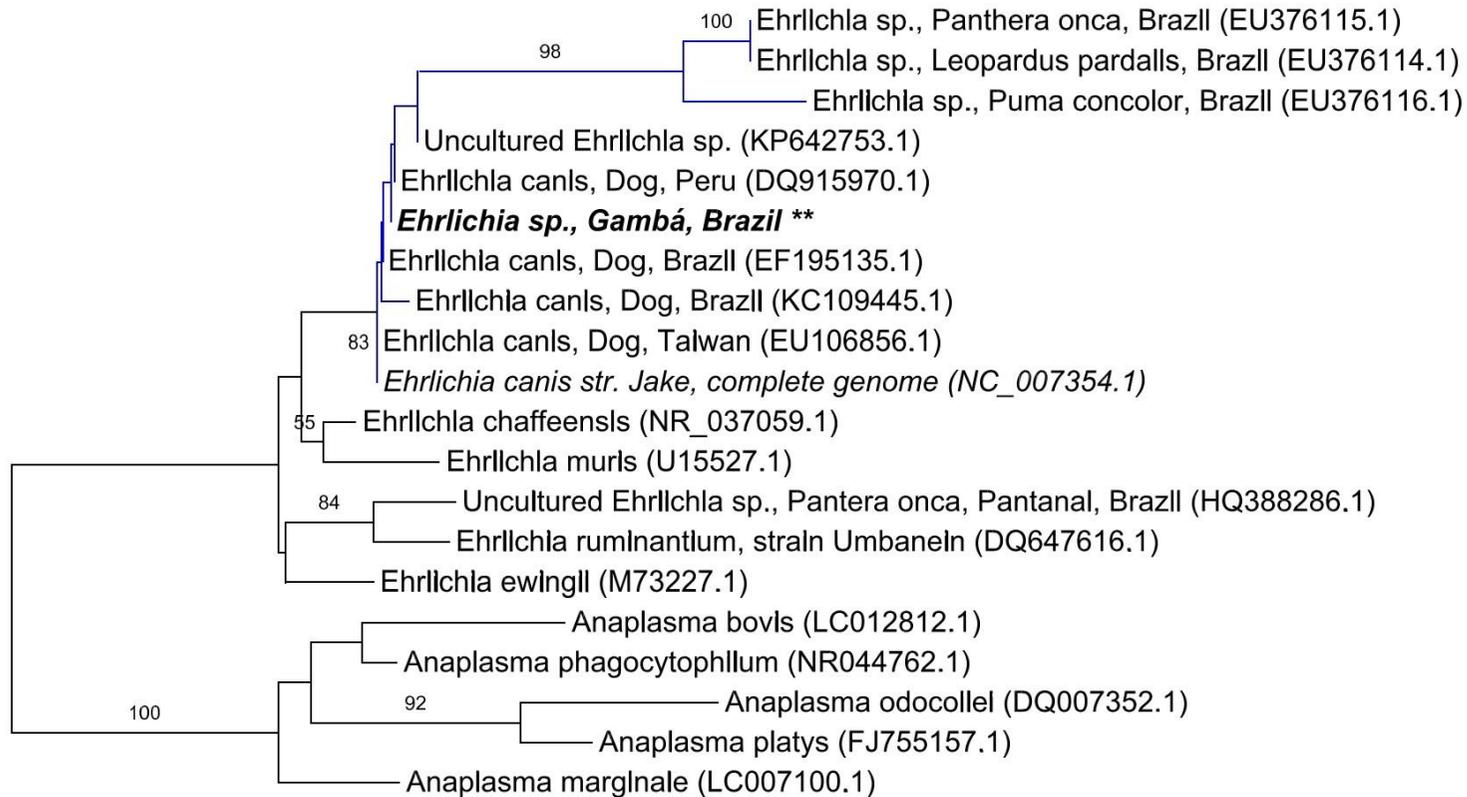
SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, n. 4, p. 193-209, 2001.

STAMATAKIS A, HOOVER P, ROUGEMONT J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Systematic Biology** 57: 758–771, 2008.

THOMPSON, J.D. et al. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, 22, 4673–4680.

WIDMER, C.E., AZEVEDO, F.C., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B., Tickborne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.11, p.1001–1005, 2011.

Figure 1. Phylogenetic position of *Ehrlichia* sp. isolated from a Brazilian opossum based on 16S rRNA DNA sequences (300 bp). The tree was constructed using the neighbor-joining method, and the numbers on the tree indicate bootstrap values for the branch points. Accession numbers are indicated.



Capítulo 4

Metagenômica como diagnóstico de doenças causadas por bactérias e levantamento de microbiota em gatos domésticos

Palavras-chave: genoma, 16SrRNA, microrganismos, felinos

1. Introdução

Metagenômica é o estudo do genoma dos microrganismos de um determinado ambiente, independente de isolamento e cultivo. Recentemente, algumas tecnologias que permitem o sequenciamento do DNA com alto rendimento (*deep sequencing* ou sequenciamento profundo, *Next Generation Sequencing – NGS* ou sequenciamento de nova geração) tornaram-se disponíveis. Estas tecnologias eram originalmente utilizadas para sequenciar o genoma, mas também são uma excelente alternativa para a pesquisa de doenças marcadas pela ativação de genes específicos e a identificação de patógenos (bactérias, vírus, fungos e parasitos) presentes no DNA do hospedeiro (BALWIERZ et al., 2009).

As vantagens destes métodos são combinar a capacidade de detecção específica de métodos moleculares convencionais com o apoio direto de evidência baseada no genoma, assim como o potencial para analisar um largo espectro de microrganismos ou genes, sem a necessidade de conceber PCR iniciadores (*primers*), e qualquer conhecimento específico dos agentes infecciosos que podem estar presentes. Outras vantagens destes métodos incluem a descoberta de fragmentos de DNA completamente inesperados e de agentes infecciosos desconhecidos. Porém ainda é uma técnica que requer alto custo de implantação, a geração de uma quantidade extremamente grande de dados, e para a análise, são necessários métodos, ferramentas e suporte de bioinformática.

O estudo genômico completo de um organismo (whole genome) permite examinar a evolução não apenas de genes únicos, mas de unidades transcricionais inteiras, cromossomos e redes celulares. Mais recentemente, a metagenômica permite o estudo, no nível genômico mais fundamental, a relação entre os micróbios e as comunidades e habitats em que vivem, permitindo o questionamento de como a adaptação de micróbios a diferentes ambientes, incluindo animais hospedeiros e outros micróbios, se manifesta em seus genomas (WOOLEY et al., 2010).

A análise dos dados é o fator limitante nos estudos de metagenômica. Até mesmo análises de similaridade em dados metagenômicos são um desafio. O aumento do tamanho dos *datasets* juntamente com a complexidade das análises computacionais deixaram a comunidade de metagenômica em uma posição insustentável, em termos de custo financeiro e flexibilidade das análises (DESAI et al., 2012). A quantidade de dados gerados cresceu rapidamente, mas as ferramentas para análise não acompanharam esta evolução.

O objetivo do presente estudo foi identificar quais bactérias estão presentes na microbiota de gatos domésticos e quais podem causar doenças através da técnica de sequenciamento de nova geração e estudos metagenômicos.

2. Material e Métodos

No presente estudo foram selecionadas duas populações de gatos domésticos da região Metropolitana do Rio de Janeiro, uma com 105 animais provenientes de abrigos para animais abandonados e outra com 178 atendidos em uma clínica veterinária especializada em felinos. Foi realizado exame clínico e coleta de amostras de sangue, realização de hemograma completo e extração do DNA com kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Promega) com posterior armazenagem à -20°C. A quantificação do DNA foi realizada primeiramente por Thermo Scientific® NanoDrop e posteriormente por fluorometria com o kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit®, considerado mais sensível. As amostras foram divididas em dendrogramas contendo oito grupos em cada população, a divisão ocorreu utilizando as informações obtidas no momento da coleta, que foram resumidas em código binário e submetidos à um programa de divisão em *clusters* (rwaspc hierarchical clustering - WESSA).

Foram selecionados 40% de indivíduos de cada população (40 de abrigos e 72 da clínica) para análise metagenômica, respeitando a proporção entre os grupos do dendrograma. Pelo fato do genoma do hospedeiro (gato doméstico) não ser totalmente mapeado e por isso impossibilitando sua diferenciação de outros genomas, efetuou-se o sequenciamento do gene 16SrRNA, para identificação das bactérias presentes no DNA. A análise foi realizada no Institute for Genome Science – The University of Maryland, utilizando a Tecnologia de Sequenciamento Illumina®.

Foi realizada uma triagem inicial com o programa Kraken (WOOD; SALZBERG, 2014) que é um sistema para classificação taxonômica de sequências curtas de DNA, normalmente obtidas através de estudos metagenômicos.

As demais análises foram executadas no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). A fim de remover sequências derivadas do hospedeiro, o genoma de *Felis catus* foi obtido do GenBank do NCBI e usado com referência no mapeamento pelo programa GMAP (WU; WATANABE, 2005), utilizando parâmetros padrão. Visto que o processo de sequenciamento pode gerar erros e sequências de baixa qualidade ou significativamente curtas, as quais podem comprometer as análises, os dados obtidos foram previamente submetidos a um controle de qualidade, utilizando-se os programas Trimmomatic, FastQC e FastQ/A_collapser.

O Trimmomatic (BOLGER et al., 2014) foi empregado para remoção de bases com qualidade <20 no início e final dos fragmentos sequenciados, bem como fragmentos de tamanho menor que 30 pb. Em seguida, os dados foram submetidos ao FastQC, e FastQ/A_collapser, presentes no pacote FASTX-toolkit 0.010 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). O FastQC foi usado para analisar o resultado das métricas previamente usadas e avaliar a qualidade do sequenciamento. Reads duplicados foram removidos dos dados através do programa FastQ/A_collapser.

Após o controle de qualidade, os reads restantes foram comparados por alinhamento com sequências não redundantes disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando o programa Diamond (BUCHFINK et al., 2015), aplicando um valor mínimo de e-value de 10⁻⁵ e cobertura de no mínimo 60% da “query”. Os grupos microbianos contidos nos metagenomas foram identificados através do algoritmo de classificação taxonômica LCA (Lowest Common Ancestor) do MEGAN (HUSON et al., 2011), com os parâmetros de escore mínimo de alinhamento = 100, e-value superior a 10⁻⁵, identidade mínima de 60%, mínimo suporte de 5 “hits”, porcentagem LCA = 80. Reads com baixa complexidade (inferior a 0.3) foram filtrados da análise.

A relação entre a qualidade do sequenciamento das bases e a posição no read está demonstrada na figura 1 e da porcentagem de cada base da composição dos reads se encontra na figura 2.

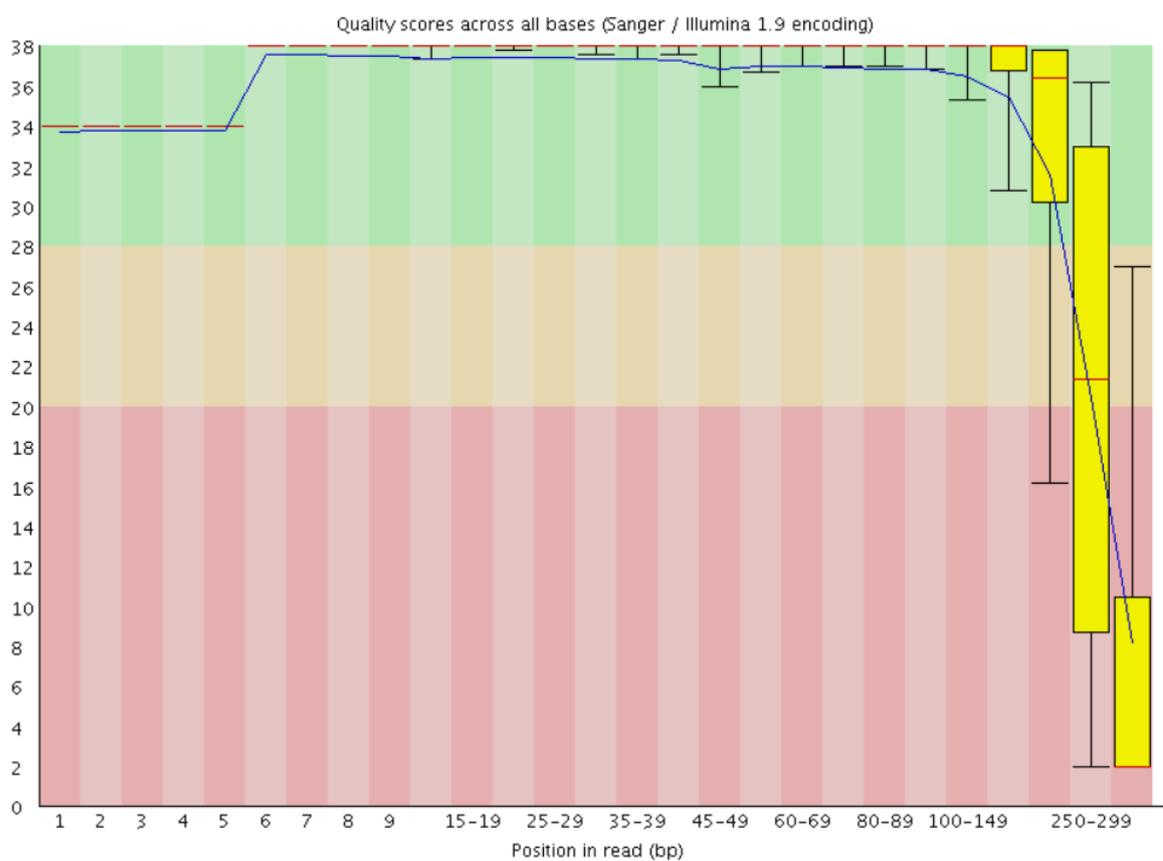


Figura 1. Pontuação de qualidade de todas as bases (sequenciamento Sanger/Illumina) em relação à posição no read (pares de base).

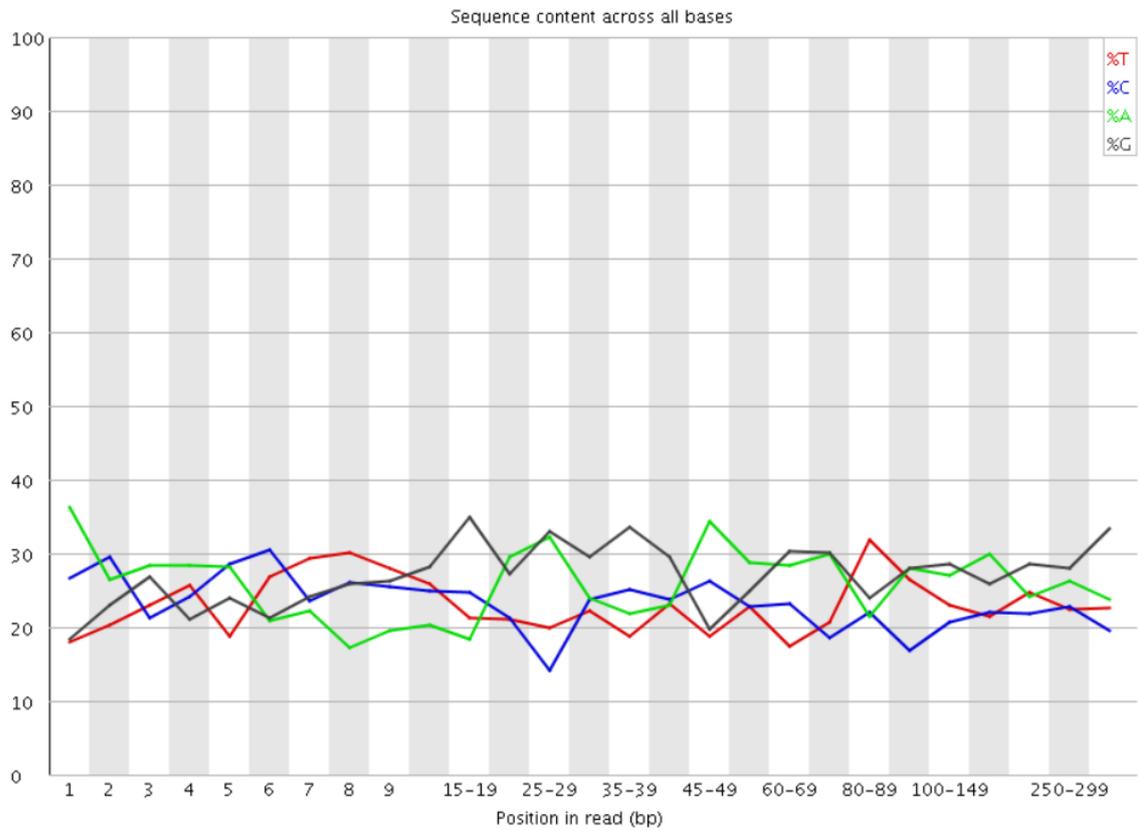


Figura 2. Conteúdo de sequência em todas as bases (porcentagem de bases A, C, T e G) em relação à posição no read (pares de base).

3. Resultados

Os resultados gerados pela análise no programa Kraken demonstraram que os gêneros de bactérias presentes com maior frequência são: *Mycoplasma*, *Escherichia*, *Rubrobacter*, *Acinetobacter*, *Bartonella* e *Staphylococcus* (Figura 3).

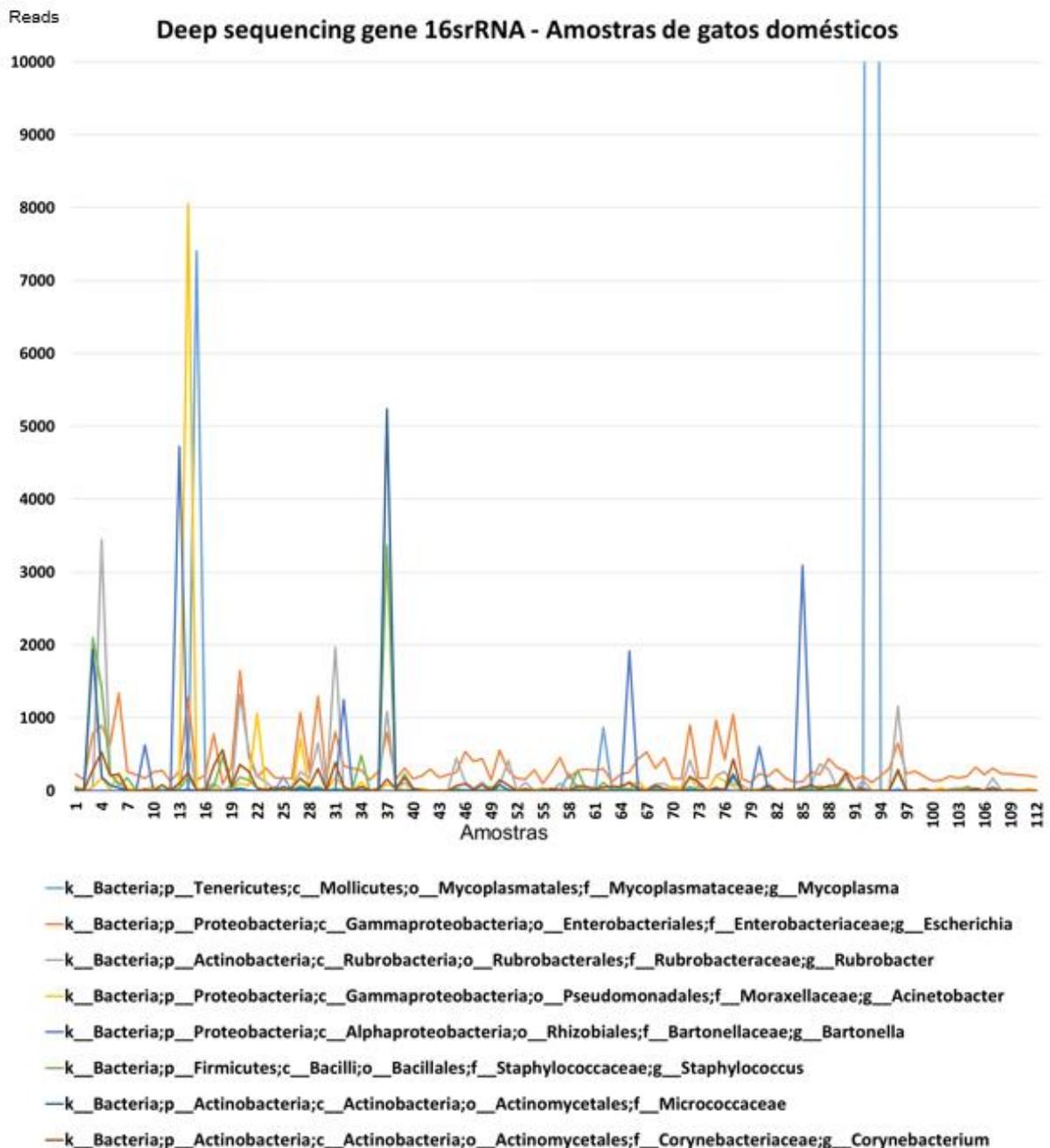


Figura 3. Relação entre os principais reads com classificação Taxonômica e as amostras de Gatos domésticos. k:reino, p:filo, c:classe, o:ordem, f:família e g:gênero.

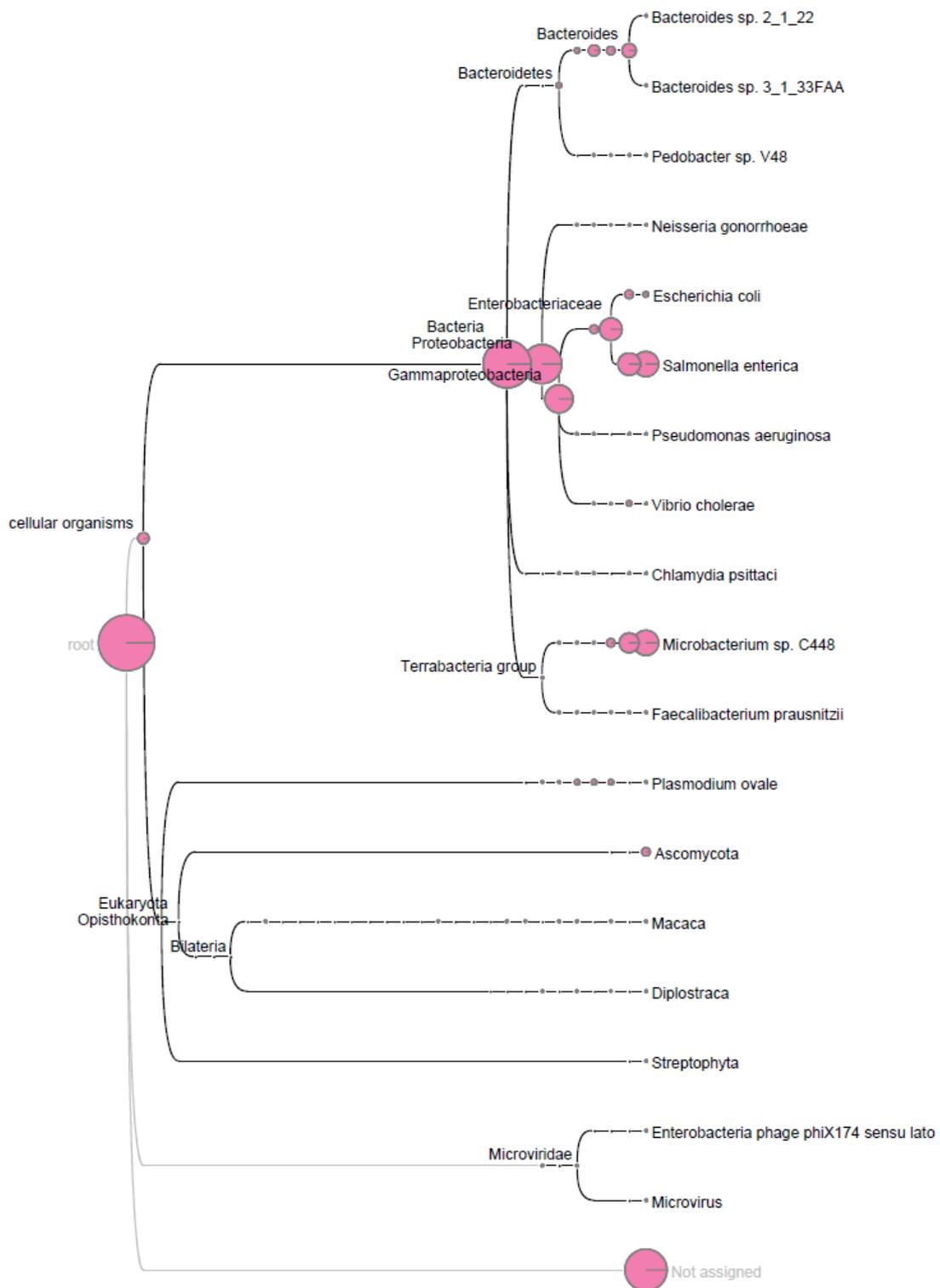


Figura 4. Identificação dos grupos microbianos contidos nos metagenomas de gatos domésticos do Rio de Janeiro identificados através do algoritmo de classificação taxonômica LCA (Lowest Common Ancestor) do MEGAN (HUSON et al., 2011), com os parâmetros de escore mínimo de alinhamento = 100, e-value superior a 10^{-5} , identidade mínima de 60%, mínimo suporte de 5 "hits", porcentagem LCA = 80.

4. Discussão

Os gêneros *Mycoplasma* e *Bartonella* são agentes que frequentemente causam doença em gatos, além de serem relevantes zoonoses, o que denota a importância da pesquisa ampla de microrganismos.

Os micoplasmas hemotrópicos são hemoparasitas bacterianos, eritrocíticos, epiteliais, agentes causadores de anemia infecciosa em diversas espécies de mamíferos. Estes agentes patogênicos foram recentemente reclassificados no gênero *Mycoplasma*, com base na análise filogenética das sequências do gene 16SrRNA (NEIMARK et al., 2001).

Bartonella é uma bactéria gram-negativa pequena transmitida por vetores artrópodes, altamente adaptadas ao seu hospedeiro, os mamíferos reservatórios, que muitas vezes podem ser assintomáticos à longo prazo. Aproximadamente 14 espécies de *Bartonella* são consideradas zoonóticas, e destas espécies, várias são transmitidas a seres humanos através de artrópodes vetores que entram em contato com reservatórios como os animais de companhia, principalmente os gatos (GUPTILL, 2010).

A bactéria *Escherichia coli* pode ser caracterizada como importante patógeno emergente, pois, apesar de existir prevalentemente como comensal da microbiota da maioria dos animais de sangue quente, pode exibir sofisticados mecanismos de virulência sendo responsável por significativas afecções clínicas em homens e animais (CALIMAN, 2010).

Acinetobacter sp. é um bacilo gram negativo, oportunista, presente no solo e na água, que acomete indivíduos imunossuprimidos, caracterizada por curso clínico fulminante. Normalmente afeta sistema respiratório, tecido cutâneo e sistema urinário devido à lesão endotelial severa. É uma bactéria de difícil tratamento, pois possui fatores intrínsecos e adquiridos que vão desencadear resistência a diversos antibióticos (REIMBERG et al., 2013).

Rubrobacter sp. normalmente é isolada em solo ou ambiente, é encontrada com certa frequência em sequenciamentos de NGS do gene 16SrRNA (SUN et al., 2014), porém não há relatos de interação com gatos.

Staphylococcus sp. e *E. coli* são frequentemente isoladas em amostras provenientes de cães e gatos, podendo causar cistites, otites e contaminação em feridas, e, muitas vezes, apresentam resistência a antimicrobianos (SCARTEZZINI et al., 2011).

O programa Kraken é um software de bioinformática de alta sensibilidade e alta velocidade, utilizando alinhamentos exatos de k-mers e um novo algoritmo de classificação. Diferente de programas anteriores que para realizar essa tarefa muitas vezes usaram técnicas de alinhamento de sequências bastante lentas, levando ao desenvolvimento de programas de estimação de abundância menos sensíveis, mas muito mais rápidos (WOOD; SALZBERG 2014).

As figuras 2 e 3 demonstram que a qualidade dos reads gerados pelo sequenciamento não foi suficiente. Fator limitador para a correta classificação dos microrganismos presentes quando submetidos ao programa MEGAN.

Nos gatos, que albergam uma extensa comunidade microbiana (na pele, trato gastrointestinal, mucosas...), pode ocorrer variações na microbiota entre os indivíduos devido à fatores externos, como alterações em seu estado fisiológico, condições estressantes, limitações nutricionais, parasitismo, doenças, entre outros.

As proteobactérias são microrganismos frequentemente presentes no DNA de gatos domésticos, dentro deste filo, os gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Microbacterium* foram os mais presentes na análise pelo MEGAN.

Salmonella spp. são bacilos Gram-negativos pertencentes à família das Enterobactérias. Tem ampla distribuição no ambiente, podem estar presentes no trato intestinal de aves, répteis

e mamíferos, inclusive no homem, sendo uma das principais responsáveis pelos quadros de gastroenterites. A principal via de infecção é a fecal-oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados, porém é possível a contaminação por intermédio do contato com animais domésticos, dentre eles, os gatos (VIEL et al., 2014).

Microbacterium tem importância na agricultura, havendo relatos em estudos de metagenomas de leguminosas, mas sem importância veterinária (MAROPOLA et al., 2015).

Na metagenômica, os dados provêm de comunidades microbianas heterogêneas, às vezes contendo mais de 10.000 espécies, com os dados da sequência que fogem do padrão (ruidosos) e tendenciosos. Da amostragem, da montagem e da predição da função, a bioinformática enfrenta novas demandas na interpretação de dados de sequência volumosos, ruidosos e muitas vezes parciais (WOOLEY et al., 2010). Este ainda é um desafio para a interpretação dos dados metagenômicos.

Houve divergência entre os dados obtidos pelo Kraken e o MEGAN, porém ambas as ferramentas identificaram grandes quantidades de reads de microrganismos que poderiam causar doenças em gatos domésticos, como *E. coli*. São necessários maiores estudos para se definir quais análises de bioinformática são mais adequadas para interpretação de metagenomas nesta espécie. A qualidade do sequenciamento é um fator limitante para obter resultados satisfatórios.

5. Referência Bibliográfica

BALWIERZ, P.J.; CARNINCI, P.; DAUB, C.O.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, O.; BELLE, W.V.; BEISEL, C.; NIMWEGEN, E.V. Methods for analyzing deep sequencing expression data: constructing the human and mouse promoterome with deepCAGE data, **Genome Biology** v.10, n.7, p.R79, 2009.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B.; Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**; v.30, n.15, p.2114-2120, 2014.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods** v.12, p.59–60, 2015.

CALIMAN, M.C.W. Estudo de vigilância bacteriológica: isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto. 2010. xvii, 95 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94957>>.

DESAI, N.; ANTONOPOULOS, D.; GILBERT, J.A.; GLASS, E.M.; MEYER, F. From genomics to metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.72-76, 2012.

GUPTILL, L. Feline Bartonellosis. **Vet. Clin. Small Anim.** v.40, p.1073–1090, 2010.

HUSON, D. H.; MITRA, S.; RUSCHEWEYH, H. J.; WEBER, N.; SCHUSTER, S. C. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. **Genome Res.** v.21, p.1552–1560, 2011.

MAROPOLA, M.K.; RAMOND, J.B.; TRINDADE, M. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). **J Microbiol Methods**. v.112, p.104-17, 2015.

NEIMARK, H., K. E. JOHANSSON, Y. RIKIHISA, AND J. G. TULLY. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemomuris*, *Candidatus Mycoplasma haemosuis* and *Candidatus Mycoplasma wenyonii*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.891–899, 2001.

REIMBERG, J. Y. A.; GUIMARÃES, K. O. P.; LIMA, S. F.; BRITO, C. P.; BARBOSA, A.; SANTOS, R. C.; SILVA, C. B.; GONÇALVES, S. Infecção sistêmica por *Acinetobacter* sp em cão – relato de caso In: **XI CONPAVE - Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 2, 2013.

SCARTEZZINI, M.; CORDOVA, D.M.; DE LIMA, D.A.; DA SILVA, J.C.J.; DE OLIVEIRA, S.J. Diagnóstico bacteriológico de diversas patologias de cães e gatos e verificação da suscetibilidade a antimicrobianos. **Veterinária em Foco**, v. 8, n. 2, p.152-157, 2011.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.4, p.1153-1161, 2011.

SUN, J.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; WEI, Q. Illumina Amplicon Sequencing of 16S rRNA Tag Reveals Bacterial Community Development in the Rhizosphere of Apple Nurseries at a Replant Disease Site and a New Planting Site. **PLoS ONE** v.9, n.10 e111744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111744>, 2014.

VIEL, P.; DEGENHARDT, R.; D'AGOSTINI, F.M. Presença de *Salmonella* spp. em fezes de gatos no município de Ouro, SC. **Unoesc & Ciência - ACBS**, v.5, n.2, p.203-208, 2014.

WOOD, D.E.; SALZBERG, S.L.: Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biology**, v.15, p.R46, 2014.

WOOLEY, J.C., GODZIK, A., FRIEDBERG, I. (2010) A Primer on Metagenomics. **PLoS Comput Biol** 6(2): e1000667. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>

WU, T. D.; WATANABE, C. K. GMAP: A genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. **Bioinformatics**, v.9, n.21, p.1859–1875, 2005.