

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**Diagnóstico dos Gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em Cães Domésticos e
Caracterização de *Anaplasma platys* na Região Metropolitana do Rio de
Janeiro**

Raquel Silva Lisbôa

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO DOS GÊNEROS *Ehrlichia* E *Babesia* EM CÃES
DOMÉSTICOS E CARACTERIZAÇÃO DE *Anaplasma platys* NA
REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

RAQUEL SILVA LISBÔA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação dos Professores
Carina Elisei de Oliveira
Adivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade Animal

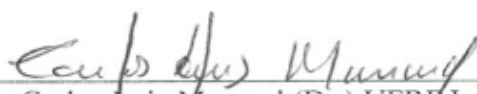
Seropédica, RJ
Abril de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

RAQUEL SILVA LISBÔA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 14/04/2010



Carlos Luiz Massard (Dr.) UFRRJ
(Orientador)



Carlos Wilson Gomes Lopes (Ph.D.) UFRRJ



Guido Fontgalland Coelho Linhares (Ph.D.) UFG



Jairo Dias Barreira (Dr.) FIOCRUZ-RJ



Kátia Regina dos Santos Teixeira (Dra.) EMBRAPA Agrobiologia

*Dedico este trabalho à minha querida família:
meu esposo Fábio pelo carinho e apoio incondicionais em todos os momentos,
meus pais Anquises e Maria Silvana, e irmãos Dalila e Douglas.
Amo muito Vocês!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente nos iluminando e amparando com o seu amor incondicional.

Agradeço ao meu amado marido e companheiro Fábio Silva de Souza, por todo amor, ajuda, por compartilhar comigo todas as alegrias e frustrações que tive durante a execução desta tese e por ter sido uma pessoa que durante estes quatro anos de doutorado foi tudo pra mim, passando de namorado a marido, sem nunca deixar de ser o meu melhor amigo e companheiro constante de todas as horas.

Agradeço também aos meus amados pais e irmãos, por terem me apoiado durante toda a minha vida acadêmica e por estarem sempre torcendo por mim e pela minha felicidade, seja onde for.

Ao professor Dr. Carlos Luiz Massard pela orientação, pela confiança e total disponibilidade do seu laboratório.

À pesquisadora Dra. Carina Elisei de Oliveira da Embrapa Gado de Corte pela acolhida em sua casa e pelos ensinamentos e co-orientação.

Ao professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pela co-orientação, apoio e incentivo.

Aos laboratórios em especial aos Médicos Veterinários Anderson Monteiro e Joana pelo fornecimento das amostras utilizadas neste estudo.

A profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista-Campus Jaboticabal, pela doação das amostras de DNA controle positivo de *Ehrlichia canis* e de *Babesia canis*, utilizadas na realização deste trabalho.

Aos Doutores Flávio Ribeiro de Araújo, Grácia Rosinha Soares e Cleber Soares pela acolhida e disponibilidade de seus laboratórios na Embrapa Gado de Corte-MS, e aos saudosos amigos que lá fiz Maribel, Cristiane Sanches, Cleber, Lenita, Renato H. Marçal, Anahí, Tiago, Fabiane e Wolney.

Aos colegas Renata Cunha Madureira e Daniel da Silva Guedes Jr. pela grande ajuda, companhia e ensinamentos durante meu estágio na Embrapa.

À Embrapa Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial a Dra. Kátia Regina dos Santos Teixeira por ter me ajudado na edição das sequências consenso final e construção das árvores filogenéticas.

Ao colega Leandro Azevedo Santos por me ensinar e ajudar com o PCR em tempo real e a todos que fazem parte do Laboratório de Nutrição de Plantas por me receberem tão bem.

Aos membros da banca, por suas valiosas correções e sugestões.

Aos colegas e bolsistas do laboratório de Doenças Parasitárias e do laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Parasitológica W. O. Neitz em especial à Aline Falqueto, Usha Vashist e Fabiano Soares da Silva.

À profa. Marília Massard da Fonseca e Dona Áurea, pelo carinho e amizade com que sempre nos receberam em suas deliciosas reuniões.

Aos queridos amigos, Adriana e André Plaza, Geisi Marine, Verônica Cardoso, Alice Cury, Luciana Rodrigues, Eliane Piranda, Paulo Cançado, Vanessa Raia, Mariza Regina, Márcia Regina, Franziska Huber, Cristiane Baldani e Daniel Macieira pela amizade, durante o tempo de convivência nesta instituição.

A todos os professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ pelo agradável convívio.

Aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo.
À CAPES e ao CNPq pela concessão das bolsas.

BIOGRAFIA

Raquel Silva Lisbôa, filha de Anquises Ferreira Lisbôa e Maria Silvina Silva Lisbôa, nasceu em 3 de Agosto de 1979, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, onde cursou o ensino fundamental no Colégio Santo Amaro e o ensino médio no Colégio Princesa Isabel, concluído em 1996, ambos localizados no bairro de Botafogo, Rio de Janeiro.

No ano de 1997, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 12 de outubro de 2002.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas e instituições, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Participou de 23 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas e em eventos científicos nacionais.

Foi bolsista de Aperfeiçoamento técnico do CNPq de março a agosto 2003, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia no Laboratório de Doenças Parasitárias, Projeto Sanidade Animal (convênio EMBRAPA/UFRRJ).

No ano de 2003 exerceu a função de estagiária voluntária em um laboratório de análises clínicas animais (Prolab), durante os finais de semana.

Em março de 2004 ingressou no mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Área de Concentração Sanidade Animal, sob orientação do prof. Adivaldo Henrique da Fonseca, onde foi bolsista da CAPES. Obteve título de Mestre em Ciências em 24 de fevereiro de 2006, com dissertação intitulada “Estudo da Transmissão Experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) por *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 e Avaliação Comparativa de Parâmetros Clínicos e Hematológicos em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758”.

Em março de 2006 ingressou no doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Área de Concentração Sanidade Animal, sob orientação do prof. Carlos Luiz Massard, onde inicialmente foi bolsista da CAPES e depois do CNPq. Em agosto de 2009 foi aprovada no Exame de Qualificação.

RESUMO

LISBÔA, Raquel Silva. **Diagnóstico dos gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em cães domésticos e caracterização de *Anaplasma platys* na Região Metropolitana do Rio de Janeiro.** 2010. 111p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Os cães podem se infectar com diversos hemoparasitos, sendo muito comum a ocorrência de coinfeções entre as espécies *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Anaplasma platys* e *Hepatozoon canis*, visto que possuem o mesmo carrapato vetor. Este estudo teve como objetivos delinear uma técnica de PCR multiplex para diagnosticar simultaneamente microrganismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em amostras de sangue de cães e realizar a caracterização parcial de fragmentos do gene 16S rRNA de agentes da família Anaplasmataceae e do gene 18S rRNA de *Babesia* detectados em algumas amostras positivas pela PCR, comparando as sequências obtidas com as sequências de outras cepas depositadas previamente no GenBank. O DNA total de 119 amostras de sangue foi extraído. Destas, 40 foram selecionadas por apresentar inclusões citoplasmáticas em leucócitos e/ou plaquetas sugestivas de infecção por agentes da família Anaplasmataceae (1E a 40E), 37 por apresentar formas parasitárias de piroplasmídeos (1B a 37B), duas por apresentar estruturas de ambos os agentes (M1 e M2) e, finalmente, 40 amostras com diagnóstico parasitológico negativo e exame hematológico sem alterações. Todas estas amostras foram testadas por PCR, para a confirmação da ausência ou presença destes hemoparasitos, e depois utilizadas no delineamento da PCR multiplex. Nas reações de PCR multiplex utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3 que amplificam um produto de aproximadamente 600pb de uma porção do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia* e os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B que amplificam um produto de aproximadamente 450pb de uma porção do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia*. A validação da PCR multiplex foi realizada por PCR multiplex em tempo-real. A PCR multiplex foi capaz de detectar simultaneamente os dois agentes em uma amostra de DNA de um cão naturalmente coinfectado e todas as infecções individuais por *Babesia*, mas não detectou todas as infecções por *Ehrlichia*. A PCR multiplex em tempo real foi mais sensível em detectar tanto infecções únicas quanto coinfeções, além de misturas de DNA positivo para os dois agentes. Os resultados dos sequenciamentos confirmaram a identidade dos isolados, e que os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B amplificaram também, o DNA de *Hepatozoon canis*. As análises filogenéticas indicaram que as espécies de *E. canis*, *A. platys*, *B. canis* e *H. canis* encontradas neste estudo possuem similaridades próximas com sequências previamente depositadas no GenBank, formando grupos monofiléticos.

Palavras-chave: PCR Multiplex, Coinfecção, Sequenciamento.

ABSTRACT

LISBÔA, Raquel Silva. **Diagnostic of the *Ehrlichia* and *Babesia* genera in domestic dogs and characterization of *Anaplasma platys* in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro.** 2010. 111p. Thesis (Doctor in Veterinary Sciences, Animal Health). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Dogs can be infected with various hemoparasites, and the occurrence of co-infections between *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Anaplasma platys*, and *Hepatozoon canis* species is very common, since they have the same tick vector. The objectives of this study were to delineate a multiplex PCR technique for the simultaneous diagnostic of microorganisms of *Babesia* and *Ehrlichia* genera in canine blood samples, and to realize the partial characterization of fragments of the 16S rRNA gene of the family Anaplasmataceae agents and, of 18S rRNA gene of *Babesia* detected in some samples PCR-positive, comparing the sequences obtained with sequences of other strains previously deposited in GenBank. Total DNA of 119 blood samples was extracted, of these, 40 were selected by showing cytoplasmatic inclusions in leukocytes and/or platelets suggesting infection by agents of Anaplasmataceae family (1E to 40E), 37 by showing piroplasms (1B to 37B), and two by presenting structures of both agents (M1 and M2), and finally, 40 samples with negative parasitological diagnostic and hematological exam without alterations. All these samples were tested by PCR to confirm the absence or presence of these hemoparasites, and them utilized in the multiplex PCR delineation. In multiplex PCR reactions the primers A17/EC3 were used to amplify an approximately 600bp region of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia* species and the primers PIRO-A1/PIRO-B were used to amplify an approximately 450bp region of the 18S rRNA gene of *Babesia* species. Validation of multiplex PCR was performed by real time multiplex PCR. The multiplex PCR was able to simultaneously detect both agents in a DNA sample of a dog naturally co-infected and all the single infections by *Babesia*, but does not detected all the *Ehrlichia* infections. The real-time multiplex PCR was more sensitive in detect both single and also co-infections, as well as positive DNA mixtures for the two agents. The sequencing results confirmed the isolates identity, and that the primers PIRO-A1/PIRO-B also amplified the DNA of *Hepatozoon canis*. Phylogenetic analysis indicated that *E. canis*, *A. platys*, *B. canis* and *H. canis* species found in this study showed close similarities with sequences previously deposited in GenBank, forming monophyletic groups.

Key words: Multiplex PCR, Co-infection, Sequencing.

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição das concentrações de cloreto de magnésio, dos oligonucleotídeos iniciadores, de Taq DNA polimerase e quantidade de DNA genômico utilizada para cada reação de PCR	31
Tabela 2. Programas de amplificação utilizados, para a identificação das sequências genéticas dos gêneros <i>Ehrlichia</i> e de <i>Babesia</i> , para cada par de oligonucleotídeos	32
Tabela 3. Concentração da agarose utilizada no preparo do gel de eletroforese para cada PCR	33
Tabela 4. Amostras amplificadas pela PCR que foram sequenciadas, indicando seus respectivos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento e o local onde o mesmo foi realizado	35
Tabela 5. Resultado do diagnóstico por meio de esfregaços sanguíneos e resultados obtidos da confirmação por PCR com os oligonucleotídeos A17/EC3 e PIRO-A1/PIRO-B, realizada em 119 amostras de sangue de cães	40
Tabela 6. Resultados da PCR multiplex em tempo real	61

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Principais doenças transmitidas por carrapatos para cães, seus agentes etiológicos, distribuição geográfica e vetores (modificado de SHAW et al., 2001)	3
Quadro 2. Classificação da ordem Rickettsiales, segundo Dumler et al. (2001)	5
Quadro 3. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação parcial dos genes 16S rRNA e 18S rRNA, com a descrição dos tamanhos dos amplicons e suas respectivas referências	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Seta indicando mórula de <i>Ehrlichia</i> em monócito de cão, em esfregaço de sangue corado com Giemsa (1.000X)	27
Figura 2. Seta indicando formas parasitárias de <i>Babesia</i> em eritrócito de cão, em esfregaço de sangue corado com Giemsa (1.000X)	28
Figura 3. Extratos de DNA total obtidos de amostras de sangue de cães. [λ]: 250ng de lambda DNA (Invitrogen [®]), [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen [®]) e [1-10]: DNA total dos cães detectados positivos para <i>Babesia</i> por meio do esfregaço sanguíneo (amostras 12B, 13B, 14B, 16B, 17B, 18B, 19B, 20B, 30B e 31B)	38
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Produtos de amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores RBC-f/RBC-r, de uma porção do gene 18S rRNA de <i>Babesia</i> (\approx 1.402pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen [®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa (40N), [3-6]: amostras positivas para <i>Babesia</i> (17B, 20B, 37B e 26B)	39
Figura 5. Sequência obtida após o sequenciamento com o oligonucleotídeo RBC-f de uma banda inespecífica amplificada, da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores RBC-f/RBC-r, da amostra 32B	39
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3, de uma porção do gene 16S rRNA de <i>Ehrlichia</i> (\approx 600pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen [®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: controle positivo (amostra <i>E. canis</i> -Jaboticabal) e [3]: amostra positiva para <i>Ehrlichia</i> (25E), [4-7]: amostras negativas para <i>Ehrlichia</i> (37E, 38E, 39E e 40E)	43
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3, de uma porção do gene 16S rRNA de <i>Ehrlichia</i> (\approx 600pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen [®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa (37N), [3]: controle positivo (amostra <i>E. canis</i> -Jaboticabal), [6, 8, 10, 11, 13 e 20]: amostras positivas para <i>Ehrlichia</i> (12E, 19E, 24E, 25E, 32E e M2), [4, 5, 7, 9, 12, 14-19]: amostras negativas para <i>Ehrlichia</i> (9E, 10E, 13E, 23E, 26E, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B)	43
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B, de uma porção do gene 18S rRNA de <i>Babesia</i> (\approx 450pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen [®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: controle positivo (amostra <i>B. canis</i> -Jaboticabal) e [4, 6-19]: amostras positivas para <i>Babesia</i> (1B, 2B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 16B, 17B e 18B), [5]: amostra negativa para <i>Babesia</i> (1E)	45

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B, de uma porção do gene 18S rRNA de *Babesia* (≈450pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®), [1]: controle negativo da reação, [2-4]: amostras positivas para *Babesia* (3B, 29B e 32B), [5]: amostra negativa para *Babesia* (36B), [6]: amostra positiva para *Hepatozoon* (M1) (≈500pb) 45

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Sensibilidade analítica da PCR com os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B (≈450pb). [M]: padrão de massa molecular Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec®), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: DNA controle positivo sem diluição (amostra *B. canis*-Jaboticabal) e [4-12]: diluição 10^{-1} a 10^{-9} , [13]: canaleta vazia 46

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Sensibilidade analítica da PCR com os oligonucleotídeos A17/EC3 (≈600pb). [M]: padrão de massa molecular Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec®), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: DNA controle positivo sem diluição (amostra *E. canis*-Jaboticabal) e [4-12]: diluição 10^{-1} a 10^{-9} , [13]: canaleta vazia 46

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos da PCR multiplex, de porções do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* (≈600pb) e 18S rRNA de *Babesia* (≈450pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®), [1]: mistura dos controles positivos – Jaboticabal (8μL da amostra *E. canis* e 4μL da amostra *B. canis*), [2]: mistura dos controles positivos – Jaboticabal (8μL da amostra *E. canis* e 4μL da amostra *B. canis*), [3]: amostra positiva de um cão naturalmente coinfectado com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2), [4]: controle negativo da reação 48

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos da PCR multiplex, de porções do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* (≈600pb) e 18S rRNA de *Babesia* (≈450pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra positiva de um cão naturalmente coinfectado com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2), [3-5]: amostras positivas de cães naturalmente coinfectados com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2, 11B e M1), [6]: amostra positiva para *Ehrlichia* (36B), [7]: mistura de 6μL de amostra positiva para *Babesia* (33B) com 6μL de amostra positiva para *Ehrlichia* (36E), [8]: mistura de 6μL de amostra positiva para *Babesia* (26B) com 6μL de amostra positiva para *Ehrlichia* (2E), [9]: mistura de 6μL de amostra positiva para *Babesia* (33B) com 6μL da amostra controle positivo para *E. canis*-Jaboticabal 48

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos da PCR multiplex, de porções do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* (≈600pb) e 18S rRNA de *Babesia* (≈450pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: controle positivo para *Ehrlichia* (amostra *E. canis*-Jaboticabal), [4]: amostra positiva de um cão naturalmente coinfectado com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2), [5, 7-10 e 12]: amostras positivas para *Ehrlichia* (1E, 11E, 12E, 19E, 20E e 25E), [6, 11 e 13-16]: amostras positivas para *Ehrlichia* que não amplificaram na PCR multiplex (2E, 24E, 32E, 33E, 35E e 36E), [17]: controle positivo para *Babesia* (amostra *B. canis*-Jaboticabal) 49

Figura 15. Eletroforeses em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Resultado obtido das purificações dos produtos das PCRs realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores RBC-f/RBC-r (≈ 1.402 pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: amostra 1B, [2]: amostra 2B, [3]: amostra 3B, [4]: amostra 4B, [5]: amostra 10B e [6]: amostra 16B 50

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Resultado obtido das purificações dos produtos das PCRs realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B (≈ 450 pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: amostra 9B e [2]: amostra 12B 50

Figura 17. Quantificação dos produtos de PCR após purificação. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com solução de Sybr Gold. [M]: padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder de 100 a 2.000pb (Invitrogen[®]), [1-2]: Purificações dos produtos de PCR, realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B – amostra M1 (≈ 500 pb) e amostra M2 (≈ 450 pb), [3-6]: Purificações dos produtos de PCR, realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3 (≈ 600 pb) - amostras 11E, 19E, 20E e M2 50

Figura 18. Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia*, utilizando *N. sennetsu* como grupo externo. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1.000 repetições. O percentual de árvores replicadas em que os táxons associados se agruparam em conjunto no teste de “bootstrap” está apresentado junto aos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura 2-parâmetros e estão nas unidades de número de substituições de base por sítio. Houve um total de 492 posições no conjunto de dados final. As análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA-4 52

Figura 19. Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia* e *Hepatozoon*, utilizando *S. arieticanis* como grupo externo. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com bootstrap de 1.000 repetições. O percentual de árvores replicadas em que os táxons associados se agruparam em conjunto no teste de “bootstrap” está apresentado junto aos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura 2-parâmetros e estão nas unidades de número de substituições de base por sítio. Houve um total de 168 posições no conjunto de dados final. As análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA-4 54

Figura 20. Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia* do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia* e *Hepatozoon*, utilizando *S. arieticanis* como grupo externo. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1.000 repetições. O percentual de árvores replicadas em que os táxons associados se agruparam em conjunto no teste de “bootstrap” está apresentado junto aos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura 2-parâmetros e estão nas unidades de número de substituições de base por sítio. Houve um total de 162 posições no conjunto de dados final. As análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA-4 55

- Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR em tempo real simples. [M]: padrão de massa molecular Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra controle positivo de *Babesia* (≈ 71 pb), [3]: controle negativo da reação, [4]: amostra controle positivo de *Ehrlichia* (≈ 82 pb) 56
- Figura 22.** Curva de dissociação (curva de “melt”) dos fragmentos em duas PCRs em tempo real simples, realizadas separadamente. As Tms de valor 75,34°C e 78,37°C representam as amplificações dos controles positivos de *B. canis* e *E. canis* – Jaboticabal, respectivamente 57
- Figura 23.** Representação da curva de amplificação da PCR em tempo real 58
- Figura 24.** Curva de dissociação (curva de “melt”) dos fragmentos de uma PCR multiplex em tempo real utilizando uma amostra de DNA coinfestado. As Tms de valor 74,08°C e 77,92°C 59 representam as amplificações obtidas da amostra M2
- Figura 25.** Curva de dissociação (curva de “melt”) dos fragmentos de uma PCR multiplex em tempo real realizada utilizando a mistura de uma amostra de DNA infectado com *Ehrlichia* (24E) com amostra de DNA infectado com *Babesia* (20B). As Tms de valor 75,23°C e 78,15°C 60 representam as amplificações obtidas para *Babesia* e *Ehrlichia*, respectivamente
- Figura 26.** Plasmídeo pGEM[®]-T Easy utilizado para a clonagem do fragmento de DNA do gene 16S rRNA de isolado cão da cidade do Rio de Janeiro (Fonte: Promega[®]) 69
- Figura 27.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Resultados obtidos para a amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 16S rRNA de *Ehrlichia* (≈ 473 pb). [PM]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb 72 (Invitrogen[®]); [1]: controle negativo da reação; [2]: amostra negativa (12N); [3]: amostra positiva (29E); [4]: amostra positiva (31E)
- Figura 28.** Consenso da sequência de *Anaplasma platys* do Rio de Janeiro, Brasil 73
- Figura 29.** Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* e *Anaplasma*, utilizando *N. sennetsu* como grupo externo. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “neighbor-joining” com “bootstrap” de 1.000 repetições, realizado pelo programa MEGA3 74

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	base prica Adenina
BLASTn	do inglês "Basic Local Alignment Search Tool - nucleotides"
C	base pirimdica Citosina
DNA	cido desoxirribonucleico
dNTPs	trifosfatos desoxirribonucleotídeos
dot-ELISA	do inglês "dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"
EDTA	cido etileno diamino tetracético
ELISA	do inglês "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"
EMC	ehrlichiose monocítica canina
G	base prica Guanina
KCl	cloreto de potássio
L	Litro
M	Molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mg	miligrama
mM	milimolar
NCBI	do inglês "National Center for Biotechnology Information"
pb	pares de bases
PCR	do inglês "Polymerase Chain Reaction"
pH	potencial Hidrogeniônico
pmol	picomol
q.s.p.	quantidade suficiente para
rDNA	ácido desoxirribonucleico ribossômico
RFLP	do inglês "Restriction fragment length polymorphism"
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RNA	cido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
rpm	rotações por minuto
T	base pirimdica Timina
<i>Taq</i>	enzima DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
TCC	trombocitopenia cíclica canina
U	unidade
V	volts
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
16S rRNA	porção 16S do RNA ribossômico
18S rRNA	porção 18S do RNA ribossômico
23S rRNA	porção 23S do RNA ribossômico
®	Marca Registrada
°C	graus Celsius
™	"Trade Mark"

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Doenças Causadas por Agentes Transmitidos por Carrapatos	2
2.2 <i>Ehrlichia</i>	4
2.2.1 Nomenclatura e classificação taxonômica	5
2.2.2 Vetores e transmissão	6
2.2.3 Manifestações clínicas e patogenia	6
2.2.4 Tratamento e profilaxia da ehrlichiose canina	7
2.3 <i>Babesia</i>	8
2.3.1 Nomenclatura e classificação taxonômica	8
2.3.2 Espécies de <i>Babesia</i> que infectam cães	9
2.3.3 Vetores e transmissão	10
2.3.4 Manifestações clínicas e patogenia	11
2.3.5 Tratamento da babesiose canina	12
2.4 <i>Anaplasma platys</i>	12
2.4.1 Vetores e transmissão	12
2.4.2 Manifestações clínicas e patogenia	12
2.4.3 Tratamento da anaplasmosose canina	13
2.5 Coinfecção	13
2.6 Métodos de Diagnóstico Utilizados e suas Limitações	15
2.6.1 Diagnóstico molecular	17
2.6.2 PCR multiplex	18
2.6.3 O método de PCR em tempo real	19
2.7 Análises Filogenéticas	21
2.7.1 Marcadores moleculares	22
2.7.2 Reação de sequenciamento	23

CAPÍTULO I

DELINEAMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA O DIAGNÓSTICO DOS GÊNEROS *Babesia* E *Ehrlichia* EM CÃES DOMÉSTICOS

RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Procedência e Seleção das Amostras	27
2.2 Locais de Execução dos Ensaios	28
2.3 Extração e Quantificação do Material Genômico (DNA)	28
2.4. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase	29
2.4.1 Seleção dos genes alvo	29
2.4.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de espécies do gênero <i>Ehrlichia</i>	29
2.4.3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de espécies do gênero <i>Babesia</i>	29
2.4.4 Controles negativos e positivos das reações de PCR	30
2.4.5 Preparo do mix para as reações de PCR e descrição das sequências térmicas utilizadas	30
2.5 Sensibilidade Analítica das PCRs	32
2.6 PCR multiplex para Detecção Simultânea de <i>Ehrlichia</i> e <i>Babesia</i>	32
2.7 Cuidados para Evitar Contaminação	33
2.8 Visualização dos Produtos Amplificados	33
2.9 Sequenciamento de Amplicons Obtidos com os Oligonucleotídeos Iniciadores A17/EC3, RBC-f/RBC-r e PIRO-A1/PIRO-B	33
2.9.1 Extração, purificação e quantificação dos amplicons do gel de agarose	34
2.9.2 Reações de sequenciamento	34
2.10 Análise dos Resultados Obtidos no Sequenciamento	35
2.10.1 Montagem das sequências consenso	35
2.10.2 Busca em bancos de dados público mundial e alinhamento múltiplo de sequências	35
2.10.3 Construção das árvores filogenéticas	36
2.11 PCR Multiplex em Tempo Real	36

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 Extração e Quantificação do DNA total	38
3.2 Amplificação com os Oligonucleotídeos RBC-f/RBC-r – <i>Babesia</i>	38
3.3 Triagem das Amostras	39
3.3.1 Amplificação com os oligonucleotídeos A17/EC3 – <i>Ehrlichia</i>	42
3.3.2 Amplificação com os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B – <i>Babesia</i>	44
3.4 Sensibilidade Analítica das PCRs	45
3.5 PCR Multiplex para Detecção Simultânea de <i>Ehrlichia</i> e <i>Babesia</i>	46
3.6 Sequenciamento de Amplicons Obtidos da PCR Realizada com os Oligonucleotídeos Iniciadores A17/EC3, RBC-f/RBC-r e PIRO-A1/PIRO-B	49
3.6.1 Purificação das reações de PCR	49
3.6.2 Análise de similaridade das sequências obtidas do sequenciamento, utilizando a ferramenta BLAST	51
3.6.3 Construção das árvores filogenéticas	52
3.7 PCR Multiplex em Tempo Real	56

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Anaplasma platys* DETECTADO EM UM CÃO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO	63
ABSTRACT	64
1 INTRODUÇÃO	65
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Origem da Amostra	68
2.2 Extração do DNA Genômico	68
2.3 Reação de PCR para o Gene 16S rRNA	68
2.4 Análise do Produto Amplificado	68
2.5 Clonagem do Produto de PCR	69
2.6 PCR de Colônia	70
2.7 Reação de Minipreparação de Plasmídeos (Miniprep)	70
2.8 Sequenciamento	70
2.9 Análise Filogenética	70

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3 CONCLUSÕES	75
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
5 ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

O estudo das parasitoses de cães tem grande importância, pois, além de muitos animais adoecerem ou morrerem em consequência do parasitismo, podem também atuar como reservatórios de ecto e endoparasitos que por ventura acometem os seres humanos.

Os carrapatos, por serem hematófagos transmitem agentes causadores de doença tais como vírus, bactérias e protozoários. Eles se fixam a seus hospedeiros, facilitando não apenas a transmissão de agentes infecciosos, como também a dispersão tanto dos carrapatos quanto dos microrganismos para diferentes áreas geográficas por meio do trânsito de animais de estimação. O carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus* é considerado um importante vetor de *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. e *Hepatozoon* spp., sendo a babesiose e a ehrlichiose caninas doenças endêmicas de grande importância veterinária em todo o Brasil.

Em cães a associação de hematozoários é frequentemente observada, podendo-se encontrar concomitantemente diversos agentes como, por exemplo: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis*. Estas relações entre hematozoários são pertinentes visto que muitos deles possuem o mesmo carrapato vetor, para cada região ocorrente, o que os torna potenciais sentinelas para doenças transmitidas por carrapatos para humanos. Essa interação entre patógenos pode acarretar graves efeitos na patogenia e na epidemiologia com comprometimentos importantes no diagnóstico, tratamento e controle.

O diagnóstico da maioria destes agentes infecciosos baseia-se, geralmente, nos sinais clínicos com auxílio de achados hematológicos, na observação direta destes por meio de exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados e na detecção de anticorpos por meio de métodos sorológicos. Entretanto, alguns pesquisadores têm considerado estes métodos imprecisos, devido à parasitemia cíclica de muitos destes microrganismos, à semelhança tanto morfológica como de sinais clínicos na patologia e à ocorrência de reações sorológicas cruzadas entre as espécies relatadas.

Os métodos de diagnóstico molecular, particularmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), são ferramentas promissoras para o diagnóstico de muitas doenças parasitárias. No Brasil, a PCR é utilizada mais frequentemente na pesquisa e sua utilidade para o diagnóstico de infecções isoladas e coinfeções por hemoparasitos em cães deveria ser avaliada, por ser considerada um dos métodos de diagnóstico de maior sensibilidade, especificidade e rapidez.

Outras técnicas resultantes de modificações da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo, a nested PCR, seminested PCR, PCR combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), PCR multiplex e PCR em tempo real.

Aliado a essas técnicas, o sequenciamento genético automatizado permite um grande número de comparações filogenéticas moleculares de espécies. Atualmente, árvores filogenéticas são amplamente utilizadas como modelo evolucionário aceito e são, na maioria das vezes, baseadas em sequências de DNA, pois, entender a origem e evolução das espécies existentes e até extintas, é uma questão científica fundamental.

Este trabalho teve como objetivos: 1- Delinear uma técnica de PCR multiplex para diagnosticar simultaneamente microrganismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Babesia*; 2- Realizar a caracterização parcial de fragmentos do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* e do gene 18S rRNA de *Babesia* de algumas amostras positivas pela PCR neste estudo e, comparar as sequências dos fragmentos obtidos com as sequências depositadas previamente no GenBank; 3- Realizar a caracterização molecular de um isolado de *Anaplasma platys* detectado em um cão da cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Causadas por Agentes Transmitidos por Carrapatos

Nas últimas décadas, as doenças causadas por agentes transmitidos por carrapatos têm ganhado maior importância devido ao crescente deslocamento de animais de estimação e ao fato de algumas espécies de carrapatos estarem encontrando nichos em diferentes condições climáticas (SHAW et al., 2001). Outro fato importante, é que uma mesma espécie de carrapato pode ser vetora de vários patógenos e a coinfeção em um único carrapato pode ocorrer (SCHOOLS et al., 1999).

As hemoparasitoses constituem um amplo grupo de parasitos que afetam os animais domésticos e silvestres e incluem vários gêneros dentre eles: *Ehrlichia*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Borrelia*, *Rickettsia* e *Mycoplasma*. As infecções por estes hemoparasitos assumem importância na saúde animal por ocasionarem patologias variadas, podendo inclusive levar à morte.

No Brasil os principais hemoparasitos de cães são *Babesia canis* (Piana; Galli-Valerio, 1985), *Ehrlichia canis* (Donatien; Lestoquard, 1935), *Anaplasma platys* (Harvey et al, 1978), *Hepatozoon canis* (James, 1905) e *Mycoplasma haemocanis* (Kikuth, 1928). A transmissão destes parasitos ocorre principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), sendo este o principal carrapato de cães de zona urbana (RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA; PEREIRA, 2001; SHAW et al., 2001).

No Quadro 1 estão apresentados os agentes infecciosos transmitidos por carrapatos mais importantes que causam severa doença clínica em cães.

Quadro 1. Principais doenças transmitidas por carrapatos para cães, seus agentes etiológicos, distribuição geográfica e vetores (modificado de SHAW et al., 2001).

DOENÇA / AGENTE	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	CARRAPATOS VETORES
BABESIOSE		
<i>Babesia canis canis</i>	Áreas tropicais e subtropicais do mundo todo	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>D. marginatus</i>
<i>B. canis vogeli</i>	Áreas tropicais e subtropicais do mundo todo	<i>R. sanguineus</i>
<i>B. canis rossi</i>	África do Sul	<i>Haemaphysalis leachi</i>
<i>B. gibsoni</i>	África, Ásia, América do Norte, Europa, Oriente Médio e no sul do Brasil	<i>H. bispinosa</i> , <i>R. sanguineus</i>
EHRLICHIOSE E ANAPLASMOSE		
<i>Ehrlichia canis</i>	Sul dos EUA, sul da Europa, África, Oriente Médio, Ásia oriental	<i>R. sanguineus</i>
<i>E. chaffeensis</i>	EUA	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>D. variabilis</i>
<i>E. ewingii</i>	EUA	Não confirmado
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	EUA, noroeste da Europa	Espécies de <i>Ixodes</i> dependendo da localização geográfica
<i>A. platys</i>	Américas, sul da Europa, Oriente Médio	Não confirmada
HEPATOZOONOSE		
<i>Hepatozoon canis</i>	Europa, Ásia, África, América Latina	<i>R. sanguineus</i> , <i>A. maculatum</i> , <i>H. longicomis</i>
<i>H. americanum</i>	América do Norte	<i>A. americanum</i>
BORRELIOSE		
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> Genogrupos:		
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Américas do Norte, Europa, Oriente Médio.	Espécies de <i>Ixodes</i> dependendo da localização geográfica
<i>B. garinii</i>	Europa, Ásia	
<i>B. afzelii</i>	Europa, Ásia	
<i>B. japonica</i>	Japão	Não confirmado
GRUPO DA FEBRE MACULOSA		
<i>Rickettsia conorii</i>	Sul da Europa, Oriente Médio, África,	<i>R. sanguineus</i>
<i>R. rickettsii</i>	EUA	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i>

2.2 Ehrlichia

O gênero *Ehrlichia* compreende parasitos intracitoplasmáticos de leucócitos do sangue circulante de várias espécies de mamíferos, sendo transmitidos biologicamente por carrapatos (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935; NEITZ; THOMAS, 1938; HUXSOLL et al., 1969; HOSKINS, 1991).

Desde 1935, tem sido demonstrado que os agentes ehrlichiais afetam diversas espécies animais, dentre estas, a equina (STANNARD et al., 1969), canina (KEEFE et al., 1982), ovina e bovina (RIKIHISA, 1991), felina (BOULOY et al., 1994) e inclusive a espécie humana (FISHBEIN et al., 1994).

Ehrlichia canis (Donatien; Lestoquard, 1935) é uma bactéria Gram-negativa, cocóide a elipsoidal e não móvel, que ocorre isolada ou em colônias, denominadas mórulas, consideradas formas características do parasito (RISTIC; HUXSOLL, 1984; RIKIHISA, 1991). É o agente causal da ehrlichiose monocítica canina (EMC) (anteriormente denominada pancitopenia tropical canina), uma doença que foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935 por Donatien e Lestoquard. Porém, este agente somente ganhou destaque durante a Guerra do Vietnã, quando produziu grandes perdas entre cães militares (HUXSOLL et al., 1970).

Logo depois foi descrita em outras partes da África, no Oriente Médio, como revisado por Ewing (1969). No Brasil, a ehrlichiose em cães foi relatada pela primeira vez em 1973, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA et al., 1973), sendo este também o primeiro caso diagnosticado na América do Sul. No Estado do Rio de Janeiro, o primeiro caso foi descrito por Carrilo et al. (1976). A doença agora possui uma distribuição quase global, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (EWING, 1969; RIKIHISA, 1991; IQBAL et al., 1994; BREITSCHWERDT, 2000).

As descobertas da ehrlichiose granulocítica humana (EGH), *E. sennetsu* (“febre sennetsu”) e o isolamento de *E. chaffeensis* em seres humanos, mostraram que a ehrlichiose não é apenas um problema médico veterinário (McDADE, 1990; ANDERSON et al., 1991; RIKIHISA, 1991; BAKKEN et al., 1994; CHEN et al., 1994; FISHBEIN et al., 1994). *Ehrlichia canis* foi descrita como sendo capaz de causar doença grave em humanos, com casos de óbito principalmente em crianças e idosos (DAVOUST et al., 1986; ENG; GILES, 1989; McDADE, 1990; BREITSCHWERDT et al., 1998). Relatos recentes indicaram que *E. canis* é um agente zoonótico que causa infecções assintomáticas ou sintomáticas em humanos na Venezuela (PEREZ et al., 1996, 2005). Além disso, existe evidência sorológica de ehrlichiose humana na Argentina e no Brasil (RIPOLI et al., 1999; CALIC et al., 2004).

A infecção em seres humanos por um microrganismo muito semelhante à espécie *E. canis* foi descrita pela primeira vez em 1987 (FISHBEIN et al., 1987; MAEDA et al., 1987), em um paciente com febre, mialgia, fraqueza e confusão mental. A ehrlichiose humana é uma causa comum de hospitalização por doença febril de causa desconhecida na Geórgia (EUA), sendo mais comum nesta região que a febre maculosa (FISHBEIN et al., 1989).

Doran et al. (1989) e Golden et al. (1989) relataram quadros clínicos diversos em crianças com sorologias positivas para *E. canis*. Altas taxas de soropositividade para *E. canis* em seres humanos com sintomas clínicos variados ocorrem em algumas regiões dos Estados Unidos (ENG et al., 1990), tendo ocorrido um surto de ehrlichiose humana em soldados do exército americano em uma área onde a doença de Lyme era endêmica (PETERSEN et al., 1989). A EGH pode apresentar-se com manifestações de pancardite, podendo causar a morte (JAHANGIR et al., 1998). Quadros clínicos bastantes diversos podem ocorrer em seres humanos infectados com *E. chaffeensis* (SEXTON et al., 1998; PATEL et al., 1999; WEAVER et al., 1999). Na década de 90 foram observados os primeiros casos de EMC

(MORAIS et al., 1991) e granulocítica (PETROVEC et al., 1997) em seres humanos na Europa.

2.2.1 Nomenclatura e classificação taxonômica

De acordo com Ristic e Huxsoll (1984), os agentes da ehrlichiose canina estariam alocados na família Rickettsiaceae Pinkerton, 1636 e na tribo Ehrlichieae Philip, 1957. Esta classificação era baseada na comparação de características fenotípicas, incluindo também a antigenicidade dos isolados.

Com base no sequenciamento de uma porção do gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) do parasito, tornou-se possível o agrupamento das espécies da tribo Ehrlichieae em 3 genogrupos distintos (ANDERSON et al., 1991): Genogrupo 1 ou de *E. canis*; Genogrupo 2 ou de *E. phagocytophila* e Genogrupo 3 ou de *E. sennetsu* (DUMLER et al., 1995; WALKER; DUMLER, 1996).

Segundo Dumler et al. (2001), recentes análises genéticas dos genes codificadores da unidade 16S rRNA, genes de proteínas de superfície e análise genética da proteína de choque térmico *groESL* indicaram que as designações taxonômicas apresentavam falhas dentro dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*. Esses autores analisaram as sequências genéticas obtidas a partir do GenBank, propondo uma nova classificação (Quadro 2). Em 2002 estas alterações foram homologadas e corrigidas.

As seguintes espécies pertencentes à Família Anaplasmataceae já foram descritas causando infecções naturais em cães: *Ehrlichia canis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935); *Anaplasma platys* (HARVEY et al., 1978); *Neorickettsia risticii* (KAKOMA et al., 1994); *E. ewingii* (ANDERSON et al., 1992a; STOCKHAM et al., 1992); *E. chaffeensis* (DAWNSON, EWING, 1992; DAWNSON et al., 1996; BREITSCHWERDT et al., 1998b) e *A. phagocytophilum* (LEWIS et al., 1975; MADEWELL et al., 1982; JOHANSSON et al., 1995; GREIG et al., 1996; PUSTERLA et al., 1997). Esta última espécie é o resultado do agrupamento e nova denominação das espécies *E. phagocytophila*, *E. equi* e do agente da EGH (DUMLER et al., 2001). Segundo Hoskins (1991) *E. canis* é a causa mais comum de infecção natural em cães, sendo também considerada a mais virulenta.

Quadro 2. Classificação da ordem Rickettsiales, segundo Dumler et al. (2001).

Família	Gênero	Espécie
Anaplasmataceae	<i>Anaplasma</i>	<i>A. centrale</i> <i>A. marginale</i> <i>A. ovis</i> <i>A. bovis</i> <i>A. platys</i> <i>A. phagocytophilum</i>
	<i>Ehrlichia</i>	<i>E. ruminantium</i> <i>E. canis</i> <i>E. chaffeensis</i> <i>E. muris</i> <i>E. ewingii</i>
	<i>Neorickettsia</i>	<i>N. helminthoeca</i> <i>N. risticii</i> <i>N. sennetsu</i>
	<i>Wolbachia</i>	<i>W. pipientes</i>

2.2.2 Vetores e transmissão

Os vetores de *E. canis* incluem o carrapato marrom do cão, *R. sanguineus*, (GROVES et al., 1975; AGUIAR et al., 2007a) e possivelmente o carrapato americano do cão, *Dermacentor variabilis* (JOHNSON et al., 1998).

O carrapato infectado, ao se alimentar nos cães inocula sua secreção salivar contaminada no local da picada, transmitindo o agente (GROVES et al., 1975). A infecção no cão inicia-se a partir dos corpos elementares que penetram nos monócitos e linfócitos, se multiplicando por divisão binária, formando os corpos iniciais que posteriormente darão origem à mórula, sendo estas, as únicas formas identificadas microscopicamente nos hospedeiros vertebrados (McDADE, 1990). A ruptura das células hospedeiras libera formas para infecção de novas células e o processo progride exponencialmente. Ao final da primeira semana após a infecção, os corpúsculos iniciais podem ser observados nas células mononucleares; ao final da segunda semana, observam-se as mórulas, que são resultado do crescimento adicional dos corpúsculos iniciais. Uma ou mais mórulas podem estar infectando a mesma célula hospedeira (MARCONDES, 2009).

Os carrapatos podem sobreviver por 155 a 568 dias como adultos não alimentados e podem transmitir a infecção por 155 dias após se infectarem. Esse fenômeno permite ao carrapato passar pelo inverno e infectar os hospedeiros definitivos durante a primavera seguinte. Por isso, é provável que o carrapato seja o principal reservatório do agente (HARRUS et al., 1997b).

Outra forma de transmissão seria por meio de transfusão sanguínea (EWING, 1969; REINE, 2004).

A transmissão do cão para o carrapato é mais fácil de acontecer durante as duas a três primeiras semanas pós-infecção no vertebrado (WOODY; HOSKINS, 1991). O carrapato *R. sanguineus* se torna infectado após ingerir sangue contaminado contendo leucócitos infectados, os corpos iniciais invadem o celoma do carrapato e infectam os hemócitos, nos quais se multiplicam, e chegam nas células das glândulas salivares podendo penetrar no intestino infectando o epitélio do mesmo (SMITH et al., 1976). A transmissão no carrapato é estritamente transtadial (GROVES et al., 1975; MATHEW et al., 1996; NEER, 1998). As larvas não são importantes para a transmissão, porque a transmissão transovariana de *E. canis* nos carrapatos não ocorre (GROVES et al., 1975).

2.2.3 Manifestações clínicas e patogenia

Historicamente, a ehrlichiose canina já recebeu vários nomes, tais como: pancitopenia tropical canina (termo ainda utilizado para descrever a forma crônica da doença) (HUXSOLL et al., 1970), riquetsiose canina, tifo canino, síndrome hemorrágica idiopática, febre hemorrágica canina, moléstia do cão rastreador (GREENE; HARVEY, 1990; HARRUS et al., 1997b), doença sangrante de Nairobi e atualmente é denominada ehrlichiose monocítica canina (HARRUS et al., 1997b).

O período de incubação da EMC é de aproximadamente uma a três semanas (HARRUS et al., 1997b). Após esse período, a doença evolui para os estágios agudo, subclínico e, em alguns casos, crônico (HARRUS et al., 1997a).

Ehrlichia canis possui predileção por células encontradas na microvascularização dos pulmões, rins e meninges de cães (HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997a, b) sendo a epistaxis causada por hemorragias características dos pulmões ou da mucosa nasal (RIKIHISA, 1991). Classicamente, três estágios clínicos têm sido diferenciados: agudo, subclínico e crônico.

Na fase aguda, sinais clínicos tais como febre, depressão, dispnéia, anorexia, linfadenopatia e ligeira perda de peso, são observados. A fase subclínica da infecção vem depois do período agudo e está associada com a persistência da infecção. Trombocitopenia, leucopenia inconstante e anemia, persistem na ausência de sinais clínicos. A fase crônica é caracterizada por hemorragias, epistaxe, edema periférico, emaciação e choque hipovolêmico, levando à morte. Achados laboratoriais mais frequentemente encontrados são trombocitopenia - sendo esta a anormalidade hematológica mais prevalente em todos os estágios da doença, aproximadamente 84% de todos os casos (TROY; FORRESTER, 1990), leucopenia, anemia e hipergamaglobulinemia (NEITZ; THOMAS, 1938; EWING; PHILIP, 1966; EWING et al., 1971; HILDEBRANDT et al., 1973; BUHLES et al., 1974; GREENE; HARVEY, 1990; WOODY; HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997b; ALMOSNY, 1998; NEER, 1998).

No Brasil, a ehrlichiose canina caracteriza-se por causar um quadro febril, associado à apatia, anorexia e desidratação, não sendo frequente a ocorrência de quadros hemorrágicos intensos (ALMOSNY, 1998). Por causa da ampla distribuição de seu vetor, a EMC é uma das doenças infecciosas de cães mais importantes no Brasil (AGUIAR et al., 2007a). Os fatores que aparentemente afetam o grau de virulência da infecção, bem como o seu progresso, incluem variações de cepas, raça do cão, idade, estado imunológico e a presença ou não de outras doenças concomitantes (WOODY; HOSKINS, 1991; NEER, 1998).

2.2.4 Tratamento e profilaxia da ehrlichiose canina

Existem várias drogas eficazes disponíveis para o tratamento das infecções por *Ehrlichia* sp. em cães como a tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina, dipropionato de imidocarb e cloranfenicol. Destas, a tetraciclina e seus derivados (tais como oxitetraciclina e doxiciclina), são considerados o tratamento de eleição há muitos anos (HUXSOLL et al., 1970; HOSKINS, 1991). Atualmente, a doxiciclina é utilizada na dosagem de 10mg/kg por via oral uma vez ao dia durante 28 dias (NEER et al., 2002). A doxiciclina é uma tetraciclina lipossolúvel bastante eficiente, pois os animais geralmente apresentam melhora clínica dentro de três dias (SAINZ, 1996). Ela também é a droga de eleição no caso de filhotes ou animais com nefropatia (COHN, 2003).

O tratamento com dipropionato de imidocarb também se mostrou efetivo na eliminação de *E. canis* (PRICE; DOLAN, 1980; MATTHEWMAN et al., 1994). No entanto, estudos mais recentes não observaram diferenças na resposta clínica quando comparado à doxiciclina, associado a esta droga (SAINZ, 1996; SOUSA et al., 2004) ou utilizado isoladamente (SAINZ, 1996; EDDLESTONE et al., 2006). A dose recomendada do dipropionato de imidocarb é de 5mg/kg, por via subcutânea ou intramuscular com intervalo de 14 dias. O pré-tratamento com atropina, 0,04mg/kg, é recomendado a fim de minimizar os efeitos adversos da droga (MATTHEWMAN et al., 1994; NEER et al., 2002).

Com o tratamento adequado, os cães se recuperam das infecções agudas, mas, os cães não tratados ou tratados inapropriadamente podem desenvolver infecções clínicas persistentes e assim podem se tornar portadores assintomáticos do organismo por anos (EWING, 1963; KELCH, 1984), podendo servir como fonte de infecção. Por isso, é extremamente importante diagnosticar a ehrlichiose canina no estágio inicial, o que pode melhorar o prognóstico dos cães tratados (IQBAL et al., 1994).

Cães infectados cronicamente possuem um prognóstico ruim e podem apresentar melhora gradual ou nenhuma melhora após o tratamento (GREENE; HARVEY, 1990). O tratamento prolongado é geralmente necessário para animais com infecções crônicas severas. Em alguns casos, pode ser necessário instituir terapia de apoio com fluidos, transfusão sanguínea, vitaminas, corticóides ou esteróides anabólicos (COHN, 2003).

A profilaxia deve ser focada no controle efetivo dos carrapatos. Quando animais de áreas endêmicas forem transportados para áreas livres, estes devem ser testados e se necessário tratados anteriormente (HUXSOLL et al., 1970). Cães doadores de sangue deverão passar por triagem com testes sorológicos ou moleculares (REINE, 2004).

2.3 *Babesia*

As espécies do gênero *Babesia* são parasitos do filo Apicomplexa, transmitidos por carrapatos, que causam doenças severas em animais silvestres e domésticos (KUTLER, 1988). Foram descritos pela primeira vez em 1888 por Victor Babés o qual observou hemácias de bovinos parasitadas. Nesta época este pesquisador procurava determinar a causa de uma doença grave, que estava acometendo os bovinos no delta do rio Danúbio, na Romênia. E, chegou à conclusão de que o agente etiológico, que estava provocando a enfermidade denominada hemoglobinúria enzoótica naquela região, era um pequeno organismo cocóide, intraeritrocítico, por ele chamado de *Haematococcus bovis*. Em 1893, Starcovici, um dos pesquisadores do grupo de Babés, reavaliou o parasito, denominando-o de *B. bovis*, em homenagem ao seu descobridor.

2.3.1 Nomenclatura e classificação taxonômica

Segundo Levine et al. (1980), o gênero *Babesia* possuía a seguinte classificação: Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae, Gênero *Babesia*.

Atualmente os protozoários do gênero *Babesia*, pertencem ao Filo Protozoa, Subfilo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Piroplasmorida, Família Babesiidae (O'DWYER; MASSARD, 2002).

A identificação de espécies do gênero *Babesia* era baseada, tradicionalmente, na especificidade do hospedeiro e no tamanho e aparência morfológica das formas intraeritrocitárias, frequentemente referidas como piroplasmas (LEVINE, 1988). Além destes antigos critérios biológicos, tais como morfologia e ciclo de vida, atualmente as ferramentas moleculares tornaram possível comparar determinadas sequências de genes do genoma de diversos protozoários (UILENBERG, 2006). Isto tem levado a novas descobertas e mudanças de gêneros.

Segundo Uilenberg (2006), a falha na transmissão transovariana de *Babesia equi* em carrapatos *Rhipicephalus turanicus* e *Hyalomma anatolicum anatolicum* (SIGRIST, 1983) e a descoberta de esquizogonia nos linfócitos de cavalos em 1981 (SCHEIN et al., 1981) mostraram que este parasito não poderia ser mantido no gênero *Babesia*. Inicialmente Mehlhorn e Schein (1993) foram cautelosos classificando *B. equi* como uma espécie de *Babesia* com estágios intralinfocíticos, enquanto outros a classificaram como *Theileria equi* (UILENBERG, 1986; EUZÉBY, 1988). Em 1998, Mehlhorn e Schein finalmente aderiram também a esta posição.

Uilenberg (2006) também cita outro exemplo, afirmando que o parasito geralmente conhecido como *Babesia microti*, certamente não é uma *Babesia*. Em 1984 foi relatada a ocorrência de esquizogonia em linfócitos do hospedeiro vertebrado infectado com *B. microti* (MEHLHORN; SCHEIN, 1984), e posteriormente estas observações foram confirmadas por Mehlhorn et al. (1986). Experimentos de transmissão transovariana falharam com *Ixodes scapularis* e *I. pacificus*, enquanto a transmissão transestadial do estágio larval para o ninfal tiveram sucesso com ambas as espécies (OLIVEIRA; KREIER, 1979), e também com *I. ricinus* (MEHLHORN et al., 1986). Além disso, os oocinetos e seu comportamento dentro do carrapato vetor *I. scapularis*, assim como em *I. dammini*, pareceu-se mais com o de *Theileria*

do que com aquele da típica *Babesia* (RUDZINSKA et al., 1984) e isto foi confirmado em *I. ricinus* (MEHLHORN et al., 1986).

2.3.2 Espécies de *Babesia* que infectam cães

Babesia canis (Piana; Galli-Valerio, 1895) e *B. gibsoni* (Patton, 1910) são reconhecidas como as duas espécies que causam a babesiose canina. *Babesia canis*, também chamada de grande babesia (3,0 a 5,0µm), geralmente aparece como um único piroplasma ou em pares simples ou múltiplos de merozoítas divididos por fissão binária dentro do eritrócito (SOULSBY, 1968). Apresenta uma ampla distribuição com alta prevalência nas regiões tropicais e subtropicais (TABOADA et al., 1992), sendo encontrada na África, Ásia, Austrália, Europa e nas Américas (MARTINOD et al., 1986; UILENBERG et al., 1989). Enquanto *B. gibsoni*, conhecida como pequena babesia (1,0 a 2,5µm), é encontrada na Ásia, América do Norte, África (LOBETTI, 1998), Europa (CONRAD et al., 1991; CASAPULLA et al., 1998; BIRKENHEUER et al., 1999) e no sul do Brasil (BRACCINI et al., 1992; TRAPP et al., 2006a).

Estudos anteriores com base na distribuição geográfica, espécie de carrapato vetor (LEWIS et al., 1996), diferenças nas propriedades antigênicas e na patogenicidade demonstraram que, apesar da semelhança morfológica entre os isolados de *B. canis* coletados por todo o mundo, estes diferem entre si (REICHENOW, 1935; UILENBERG et al., 1989; HAUSCHILD et al., 1995; SCHETTERS et al., 1997).

Assim, Uilemberg et al. (1989) propuseram um sistema trinomial de nomenclatura para diferenciar as três subespécies de *B. canis* em um nível taxonômico: *Babesia canis canis* transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* na Europa; *B. canis vogeli*, transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* no norte e sul da África, na América, Ásia, Austrália e Europa e *B. canis rossi* transmitida por *Haemophysalis leachi* na África do Sul. No Brasil, *B. canis vogeli* é a principal subespécie que acomete os cães (VIDOTTO; TRAPP, 2004).

Citard et al. (1995) revelaram haver grande variedade genética entre os diversos isolados de *B. canis*. Essa variabilidade foi demonstrada por Zahler et al. (1998), que discriminaram três genogrupos de *B. canis*, com base em características genotípicas, correspondentes às subespécies propostas anteriormente. Já Carret et al. (1999), distinguiram as três subespécies por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), comprovando haver variedade genética entre os diferentes isolados de *B. canis*.

Tradicionalmente, todos os pequenos piroplasmas caninos eram identificados como *B. gibsoni* com base na suposição de que nenhuma outra espécie de pequena *Babesia* infectava cães (CACCIÒ et al., 2002). Segundo Kjemtrup et al. (2000a), os isolados de *B. gibsoni* são morfológicamente idênticos, porém, análises filogenéticas do gene 18S rRNA têm mostrado que existem pelo menos três espécies distintas: uma da Ásia, outra da Califórnia e uma terceira da Europa. O isolado asiático é o organismo original encontrado na Índia, sendo considerado *B. gibsoni sensu stricto* (PATTON, 1910; TRAPP et al., 2006b). O isolado da Califórnia é uma espécie diferente com algumas características do gênero *Theileria* (KJEMTRUP et al., 2000b). E, o nome *B. conradae* foi recentemente proposto para este isolado (KJEMTRUP et al., 2006). O isolado da Europa é uma *Theileria*, com parentesco próximo a *B. microti* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003), que tem sido nomeada *Theileria annae* (ZAhLER et al., 2000; CAMACHO et al., 2001).

Birkenheuer et al. (2003) assinala a importância de se diagnosticar as espécies, subespécies e genótipos que causam a babesiose canina, uma vez que a virulência, prognóstico e resposta às drogas babesicidas podem ser diferentes para cada microrganismo.

2.3.3 Vetores e transmissão

Os carrapatos são os únicos vetores biológicos de parasitos da família Babesiidae (LEVINE, 1971). Os vetores da babesiose canina são carrapatos da família Ixodidae (MAHONEY, 1977).

Na década de 30, foi demonstrado que carrapatos *R. sanguineus* eram capazes de transmitir *B. canis vogeli* de um cão naturalmente infectado para outro não infectado (REGENDANZ; MUNIZ, 1936). Esta espécie é a mais comum no Brasil, sendo também a principal vetora de *B. gibsoni* além de estar sempre presente em áreas onde a babesiose canina é endêmica (ARAGÃO; FONSECA, 1961; LABRUNA; PEREIRA, 2001; DANTAS-TORRES et al., 2004b). Outros dois vetores conhecidos de *B. gibsoni*, *Haemaphysalis longicornis* e *H. bispinosa* (SWAMINATH, 1937; GROVES; DENNIS, 1972; OTSUKA, 1974), ainda não foram identificados no Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Por fim, as subespécies *Babesia canis canis* e *B. canis rossi* são transmitidas pelos carrapatos *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*, respectivamente (UILEMBERG et al., 1989).

Estes protozoários são transmitidos ao cão por meio da saliva de um carrapato infectado enquanto este se alimenta. Os esporozoítos infectantes presentes nas glândulas salivares penetram nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado onde se diferenciam em trofozoítos. Estes se multiplicam por fissão binária (reprodução assexuada) e dão origem a dois, quatro, oito ou mais merozoítos. Após intensa multiplicação, os eritrócitos se rompem e os merozoítos livres tornam a invadir outros eritrócitos (UILEMBERG, 2006). Alguns trofozoítos aumentam de tamanho e assumem um aspecto ovóide, sendo chamados de gamontes (WENYON, 1926; MARCONDES, 2009).

Quando ingeridos por um carrapato, os trofozoítos que não se diferenciaram em gamontes não se desenvolvem. Já os gamontes, penetram nas células epiteliais do intestino, onde adquirem projeções citoplasmáticas que lhes conferem um aspecto raiado (“ray-bodies”) (KOCH, 1906). Estas formas uninucleadas fundem-se, formando um zigoto móvel (MEHLHORN; SCHEIN, 1984) que por sua vez dará origem a um cineto (algumas vezes referidos como “vermículos”), alongado e móvel, que se multiplica e deixa a célula intestinal, caem na hemocele, invadindo vários órgãos do carrapato, onde dará origem a vários esporocinetos. Alguns esporocinetos invadem os ovários onde se multiplicam e penetram nos oócitos, conseqüentemente infectando os ovos e transmitindo a infecção para a próxima geração (transmissão transovariana) (UILEMBERG, 2006). Este tipo de transmissão permite a manutenção da infecção nos carrapatos vetores por várias gerações sucessivas (BRUMPT, 1926, 1938; SHORTT, 1973).

Na transmissão transestadial, os parasitos se desenvolvem na hemocele das larvas originárias dos ovos infectados, das ninfas e dos adultos provenientes dessas larvas; ou na hemocele do carrapato que se infecta no estágio de larva ou ninfa e transmite ao se alimentar como ninfa ou adulto em outro hospedeiro. Multiplicam-se originando pseudocistos, que se rompem liberando os parasitos, estes invadem e multiplicam-se nos músculos do carrapato, por diversas divisões binárias. Não há infecção em outros órgãos até que o estágio posterior inicie sua alimentação no hospedeiro, os parasitos migram até as glândulas salivares, onde penetram e se multiplicam formando os esporozoítos infectantes (VIDOTO; TRAPP, 2004; UILEMBERG, 2006). O carrapato só se torna transmissor-infectante após a fixação, quando os esporozoítos amadurecem tornando-se verdadeiramente infectantes (UILEMBERG, 2006). Reichenow (1935) observou que todos os três estágios de *R. sanguineus* podem transmitir *B. canis*, porém, os adultos tanto machos quanto fêmeas, seriam transmissores mais eficientes, enquanto as larvas só transmitiriam quando usadas em grande número.

Nos carrapatos que exigem para seu ciclo evolutivo mais de um hospedeiro (como é o caso de *R. sanguineus*), pode ocorrer tanto a transmissão transestadial (SHORTT, 1936) quanto a transmissão transovariana (BRUMPT, 1937).

Em um estudo realizado no Japão com cães da raça Tosa com e sem histórico de brigas, demonstrou maior incidência de *B. gibsoni* no grupo com histórico de brigas. Os autores sugeriram que os cães desta raça infectaram-se com o sangue do animal parasitado no momento da briga (MATSUU et al., 2004). Fukumoto et al. (2005) relataram a primeira confirmação de transmissão transplacentária da infecção de *B. gibsoni*. Um grupo de cadelas prenhas foi infectado ocorrendo um abortamento e o nascimento de quatro filhotes, todos os quatro apresentaram hipotermia, coma, anemia, disorexia, esplenomegalia e hepatomegalia antes de morrer, além disso, o DNA de *B. gibsoni* foi detectado nos tecidos dos cinco filhotes, indicando que houve a infecção destes filhotes, provavelmente por via transplacentária.

2.3.4 Manifestações clínicas e patogenicia

A doença pode manifestar-se sob as formas subclínica, aguda, hiperaguda e crônica, sendo que cães jovens são mais sensíveis e frequentemente apresentam as formas mais graves da doença (BREITSCHWERDT, 1993). Caracteriza-se por febre, anemia hemolítica, eventualmente hemoglobinúria, e em casos graves, morte (TABOADA; MERCHANT, 1991; YAMANE et al., 1993a; LOBETTI, 1998; KJEMTRUP; CONRAD, 2000). Pode ocorrer icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia, coração e rins amarelados (ABDULLAHI et al., 1990).

A gravidade das manifestações clínicas está associada a diversos fatores, tais como: patogenicidade da espécie ou cepa envolvida, intensidade da parasitemia, resposta imune e idade do hospedeiro, nível de desafio do carrapato e estresse (MARTINOD et al., 1986; URQUHART, et al., 1996; SCHETTERS et al., 1997; JEFFERIES et al., 2003).

No Brasil, a forma subclínica da babesiose canina é provavelmente a apresentação predominante nos cães infectados (VIDOTTO; TRAPP, 2004). Relatos sugerem que as subespécies *B. canis canis* e *B. canis vogeli* possuem de baixa a moderada patogenicidade, com animais apresentando parasitemia transiente e infecção inaparente. A forma aguda é observada principalmente em infecções por *B. gibsoni* ou por *B. canis rossi*, sendo que esta última possui alta patogenicidade induzindo a doença fulminante pelo aumento exponencial da parasitemia (SCHETTERS et al., 1997). A cepa da África do sul, transmitida pelo carrapato *H. leachi*, é considerada a mais patogênica (UILENBERG et al., 1989).

Não existem sintomas patognomônicos da babesiose, sendo o diagnóstico clínico baseado na anamnese e em sinais clínicos como febre, anemia, icterícia, anorexia, letargia, linfadenopatia e esplenomegalia (ABDULLAHI et al., 1990). Entretanto, estes sinais são comuns a outras doenças, como por exemplo, leptospirose, ehrlichiose, anaplasiose, micoplasmose, cinomose e hepatite. Portanto, para um diagnóstico específico e definitivo é necessária a identificação do agente etiológico.

Casos de babesiose canina têm sido relatados em muitos estados brasileiros, tais como Rio Grande do Sul (BRACCINI et al., 1992), São Paulo (DELL'PORTO et al., 1993; LUCIDI et al., 2004; ANTONIO et al., 2009; O'DWYER et al., 2009), Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2004a), Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2004; SÁ et al., 2006), Minas Gerais (RIBEIRO et al., 1990; BASTOS et al., 2004; PASSOS et al., 2005) e Paraná (TRAPP et al., 2006b).

2.3.5 Tratamento da babesiose canina

O dipropionato de imidocarb, administrado na dose de 5mg/kg, via subcutânea, e repetida após 14 dias, é altamente eficaz em cães com babesiose e com infecções mistas com *E. canis* (LAPPIN, 2006).

O aceturato de diaminazeno pode ser administrado na dose única de 3,5mg/kg, via subcutânea, sendo eficaz nas infecções principalmente de filhotes, onde o dipropionato de imidocarb é contra indicado. A doxiciclina na dose de até 10mg/kg, via oral, duas vezes ao dia também pode ser eficaz no controle da doença (TABOADA, 1998).

O metronidazol administrado (25mg/kg, via oral, duas ou três vezes ao dia) durante duas a três semanas ou o hidrocloreto de clindamicina administrado (12,5mg/kg, via oral, duas vezes ao dia) por duas a três semanas podem diminuir a doença clínica, se outros fármacos não estiverem disponíveis. A terapia de suporte (sangue ou seus derivados, fluidos, etc.) deve ser instituída sempre que necessário, e o controle de carrapatos é fundamental na prevenção da babesiose (LAPPIN, 2006).

Mas existem algumas limitações quanto ao tratamento das infecções por determinadas espécies. O imidocarb reduz a morbidade, mortalidade e parasitemia nas infecções por *B. gibsoni* (genótipo asiático), mas não é curativo. Esta espécie é considerada virulenta em cães e, até o momento, nenhum tratamento babesicida tem sido capaz de eliminar a infecção (YAMANE et al., 1993a; BOOZER; MACINTIRE, 2003; BIRKENHEUER et al., 2004; TRAPP et al., 2006b).

2.4 *Anaplasma platys*

Anaplasma platys é um microrganismo intracelular obrigatório que parasita unicamente trombócitos de cães, sendo responsável pelo aparecimento de um quadro clínico denominado trombocitopenia cíclica canina (TCC) (HARRUS et al., 1997a; HUANG et al., 2005). Foi primeiro descrito em 1978, nos Estados Unidos da América por Harvey et al., que visualizaram em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, corpúsculos de inclusão basofílicos em plaquetas de cães trombocitopênicos, sendo inicialmente nomeado como *Ehrlichia platys*. Dumler et al. (2001) ao analisarem um fragmento do gene 16S rDNA, reclassificaram esse organismo como pertencendo à família Anaplasmataceae ao gênero *Anaplasma* (Quadro 2).

2.4.1 Vetores e transmissão

O modo natural de transmissão do agente não foi conclusivamente determinado, mas o carrapato *R. sanguineus* tem sido incriminado como o principal transmissor (WOODY; HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997a), já que o DNA de *A. platys* tem sido amplificado em carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (INOKUMA et al., 2000; PAROLA et al., 2003). Entretanto, a transmissão experimental de *A. platys* com estas espécies de carrapatos não foi demonstrada (SIMPSON et al., 1991). Woody e Hoskins (1991) relatam a possibilidade de transmissão direta pela inoculação de sangue infectado em animais susceptíveis.

2.4.2 Manifestações clínicas e patogenia

O período de incubação após a infecção experimental em cães dura cerca de oito a 15 dias (BREITSCHWERDT, 2000). A infecção aguda por *A. platys* é caracterizada por parasitemia cíclica de plaquetas seguida de trombocitopenia e linfadenomegalia generalizada

(BAKER et al., 1987). Cães infectados normalmente não se apresentam clinicamente doentes e raramente demonstram sinais de hemorragia, até mesmo os que têm grave trombocitopenia (HARVEY et al., 1978; WOODY e HOSKINS, 1991; CHANG et al., 1996). A elevação transitória na temperatura retal é um dos achados clínicos (SWANGO et al., 1992). Na fase crônica o ciclo natural de plaquetas algumas vezes diminui, resultando em trombocitopenias cíclicas associadas com parasitemias esporádicas (HARVEY et al., 1978; CHANG et al., 1996).

Não existem sintomas patognomônicos da trombocitopenia cíclica canina, que ocorre comumente associada a outras doenças (CHANG et al., 1996).

2.4.3 Tratamento da anaplasmose canina

Recomenda-se o tratamento com tetraciclina ou seus derivados, como para as ehrlichias (HOSKINS, 1991; WOODY; HOSKINS, 1991).

O momento adequado de parada do tratamento da infecção depende tanto do tipo de antibiótico administrado quanto do estágio da doença. Portanto, a duração do tratamento com antibiótico para a TCC varia de caso para caso, especialmente no estágio crônico, o qual geralmente requer um longo regime terapêutico (CHANG et al., 1997).

Chang et al. (1997) avaliaram o tratamento de um cão com tetraciclina e dois cães com doxiciclina, os três tinham sido inoculados experimentalmente com sangue infectado por *A. platys*. Os tratamentos foram iniciados logo no início da parasitemia. O tratamento com tetraciclina foi realizado por duas semanas, mas embora as anormalidades hematológicas da trombocitopenia cíclica tenham desaparecido, algumas plaquetas parasitadas reapareceram após o fim do tratamento, e o cão se tornou um portador. As durações dos regimes de antibiótico, dos outros dois cães tratados com doxiciclina, foram determinadas pelos resultados da nested PCR. O tratamento foi retirado após oito dias e o monitoramento continuou por três semanas. As contagens de plaquetas destes cães permaneceram dentro da normalidade e o agente etiológico não foi detectado tanto por meio de esfregaços sanguíneos quanto pela nested PCR, indicando completa eliminação do agente.

2.5 Coinfecção

A infecção simultânea em uma espécie animal por organismos transmitidos por carrapatos pode ocorrer como o resultado da transmissão de múltiplos agentes pelo mesmo carrapato vetor ou pela transmissão independente de infecções por diferentes carrapatos em diferentes momentos. Os cães estão, logicamente, mais expostos ao risco de coinfecção do que os humanos devido à maior probabilidade de estarem infestados simultaneamente com numerosos carrapatos ou com diferentes espécies ao mesmo tempo, tornando-os potenciais sentinelas para doenças transmitidas por carrapatos a humanos (KORDICK et al., 1999).

O carrapato *R. sanguineus* é considerado o mais importante vetor de *Ehrlichia*, *Babesia* e *Anaplasma* para os cães, em diversas regiões do mundo (GROVES et al., 1975; INOKUMA et al., 2000). Desde 1957, em áreas onde era comum a infestação de cães com *R. sanguineus*, já ocorriam relatos de infecções concomitantes de *B. canis* com *E. canis* (BOOL; SUTMOLLER, 1957; EWING; PHILIP, 1966).

Segundo Ewing e Buckner (1965), a alta mortalidade mencionada nos primeiros relatos de *E. canis*, citando como exemplo, a síndrome descrita por Shirlaw em 1938 provavelmente ocorreu, devido ao resultado de uma infecção mista por *Ehrlichia* e *Babesia*. O objetivo original das investigações de Ewing e Buckner (1965), ao pesquisarem cães infectados com *B. canis*, era determinar se os corpúsculos de inclusão observados dentro do citoplasma dos leucócitos representavam uma fase esquizogônica, ainda não descrita, do ciclo

de vida deste parasito. Porém, estes pesquisadores descobriram que as estruturas observadas poderiam ser *E. canis* e que os dois agentes estavam envolvidos.

Em cães a associação de hematozoários é frequentemente observada, podendo-se encontrar simultaneamente as espécies *E. canis*, *B. canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* (EWING; BUCKNER, 1965; IQBAL et al., 1994; TRAPP et al., 2006b). Tem-se relatado ainda *E. canis* com *E. ewingii* ou *A. platys* e *Babesia* spp. com *Ehrlichia* spp. e *Borrelia burgdorferi* (BREITSCHWERDT et al., 1994; RIKIHISA et al., 1994; BREITSCHWERDT et al., 1998b; SUKASAWAT et al. 2000; SUKASAWAT et al. 2001; MOREIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2007). Estas relações entre hematozoários são pertinentes visto que muitos deles possuem o mesmo carrapato vetor, para cada região ocorrente (IQBAL; RIKIHISA, 1994; EREMEEVA et al., 1995).

Segundo Shaw et al. (2001) a coinfeção com combinações de espécies de *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Leishmania* e *Rickettsia*, em cães, ocorre comumente em áreas endêmicas.

A interação entre patógenos, que possuem a mesma fonte de infecção, pode ser frequente e significativa podendo acarretar efeitos graves na patogenia e na epidemiologia com comprometimentos importantes para o diagnóstico, tratamento e controle. Como exemplo, *E. canis*, além de exacerbar a infecção por *B. canis*, frequentemente produz sintomas similares. Coinfecções por *E. canis* e *B. gibsoni* também têm sido reportadas resultando em uma mistura confusa de sintomas (GRAY, 1999).

Em um caso de infecção associada envolvendo *E. canis* e *Babesia* sp., Klag et al. (1991) relataram a presença de anemia, trombocitopenia, esplenomegalia, linfadenopatia e sangramentos anormais no animal. A anemia apresentada pelo animal mostrou indícios de resposta medular nos três primeiros dias de hospitalização, quando as evidências de regeneração cessaram. Os autores supuseram que a presença de ambos os agentes possa ter sido responsável por essa mudança no quadro do animal e da falta de resposta à terapia, contribuindo assim para a gravidade do caso.

No Brasil, O'Dwyer et al. (1997) relatou a ocorrência de infecção múltipla por *B. canis*, *H. canis* e *Mycoplasma haemocanis* (*Haemobartonella canis*) em um cão esplenectomizado.

Macieira (2003) também observou casos de infecções associadas de *Ehrlichia* com *Babesia*. De oito animais positivos para *Babesia*, pela avaliação do esfregaço sanguíneo, dois apresentaram resultados PCR-positivos para *E. canis*.

Em um estudo realizado por Brown et al. (2006), sobre o impacto das infecções por *B. canis vogeli* e *A. platys* sobre a contagem de plaquetas de cães de rua de oito comunidades na Austrália, mostrou que de 115 cães positivos, 24 estavam coinfectados e que destes, 13 estavam trombocitopênicos. Estes autores concluíram que a média de plaquetas dos cães jovens coinfectados era significativamente menor do que a dos infectados apenas por um dos agentes.

Trapp et al. (2006b) analisaram o sangue de 16 cães com corpúsculos de inclusão intraeritrocíticos e detectaram pela técnica de PCR quatro cães positivos para *B. gibsoni* destes, dois estavam infectados com *E. canis* e os outros dois com *Mycoplasma haemocanis*. Corpúsculos de inclusão intraeritrocíticos sugestivos de haemoplasmose foram encontrados nos esfregaços sanguíneos periféricos de ambos os cães simultaneamente infectados com *B. gibsoni* e *M. haemocanis*.

Heyman et al. (2007) relataram o caso de um cão coinfectado com *Babesia* e *A. platys*. O gênero *Anaplasma* foi detectado pela PCR do gene 16S rRNA e a espécie confirmada pelo método do sequenciamento, já *Babesia* só foi detectada pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos e por reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os autores justificam o resultado de PCR negativo para *Babesia* devido à concentração muito baixa do

parasito para ser detectada pela PCR no momento da coleta da amostra de sangue, citando como exemplo uma infecção crônica.

Para identificar os patógenos transmitidos por carrapato nos cães, Yabsley et al. (2008) conduziram uma pesquisa sorológica para *E. canis* em 2004, e uma sorologia ampla junto com uma pesquisa molecular para uma variedade de patógenos transmitidos por carrapatos em 2006. Estes autores encontraram os seguintes patógenos: *E. canis*, *B. canis vogeli*, *A. platys*, *H. canis*, *Bartonella* sp. e *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii* e a coinfeção com dois ou três destes patógenos em oito cães.

Uma síndrome que se acredita ser apenas uma doença infecciosa específica pode ser descoberta como sendo causada por mais de um agente etiológico. Desta forma é necessário que as manifestações clínicas específicas da doença sejam reconhecidas e, na medida do possível, diferenciadas e o agente responsável identificado (EWING; BUCKNER, 1965).

2.6 Métodos de Diagnóstico Utilizados e suas Limitações

O diagnóstico desse grupo de hemoparasitos é realizado, principalmente, com base nos sinais clínicos e achados hematológicos, pela observação direta em esfregaços sanguíneos corados por meio de exame microscópico, pela detecção de anticorpos por meio de métodos sorológicos e por técnicas de PCR.

O diagnóstico clínico é feito com base nos sintomas e histórico de infestação por carrapatos. Entretanto, como estes sintomas são inespecíficos, deve-se realizar exames laboratoriais para confirmar a suspeita clínica (O'DWYER; MASSARD, 2002).

Estes agentes podem ser visualizados diretamente por meio do exame parasitológico de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa ou pela coloração de Romanowsky (HARVEY et al., 1978; WOODY; HOSKINS, 1991; TABOADA, 1998; MARTIN et al., 2005). Os esfregaços devem ser efetuados utilizando apenas a primeira gota de sangue da ponta da orelha, porque esta corresponde verdadeiramente, ao sangue periférico (NEITZ; THOMAS, 1938).

O diagnóstico de *B. canis* realizado pela observação direta do agente no esfregaço sanguíneo é altamente específico, porém, apresenta baixa sensibilidade, pois a parasitemia é variável, dificultando a visualização de eritrócitos circulantes parasitados (VERCAMMEN et al., 1995), não sendo possível distinguir morfologicamente cepas e espécies semelhantes (KRAUSE et al., 1996). A não detecção do parasito em esfregaço sanguíneo não significa ausência de infecção. Além disso, sabe-se que, existem variações nas manifestações patológicas entre as espécies e subespécies de *B. canis* e, portanto, a detecção e identificação acurada são imperativas no diagnóstico de infecções individuais (JEFFERIES et al., 2007).

As mórulas de *E. canis* e *A. platys* também são difíceis de detectar no exame do esfregaço sanguíneo, só aparecendo na fase aguda da doença e, mesmo assim, em pequena quantidade, tendo assim uma baixa sensibilidade e grande ocorrência de falsos negativos (FRENCH; HARVEY, 1983; RIKIHISA, 1991; WOODY, HOSKINS, 1991; IQBAL et al., 1994; NEER, 1998; SUKSAWAT et al., 2000). Também, deve ser dada maior atenção a este tipo de diagnóstico, uma vez que corpúsculos de inclusão de *E. canis* podem ser observados em plaquetas (ALMOSNY, 1998; MYLONAKIS et al., 2003), e a ocorrência de granulações por ativação plaquetária não pode ser descartada (FERREIRA et al., 2008).

Outro obstáculo do diagnóstico microscópico é saber diferenciar as estruturas observadas. *Leishmania donovani*, *Hepatozoon canis*, *B. canis* e *B. gibsoni* fagocitadas e/ou sobrepostas, precipitados de corantes e artefatos sobre os leucócitos podem ser confundidos com estruturas características de *Ehrlichia* sp. (NEITZ; THOMAS, 1938).

O diagnóstico parasitológico, pós-morte, de *Babesia* pode ser realizado durante a necropsia, por meio da confecção de aposição de fragmento de diferentes órgãos (“imprints”), fixados com metanol e corados por Giemsa (ABDULLAHI, et al., 1990).

Um método de diagnóstico alternativo para *E. canis* é o seu cultivo *in vitro* em células, podendo ser realizado em células de linhagem originária de histiocitoma canino – DH82 (KEYSARY et al., 1996; UNVER et al., 2001; TORRES et al., 2002; AGUIAR et al., 2007b); macrófago peritoneal canino (STEPHENSON; OSTERMAN, 1977), monócito primário canino (HEMELT et al., 1980), célula endotelial humana (DAWSON et al., 1993) e células macrofágicas de camundongos BALB/C (KEYSARY et al., 2001).

Iqbal et al. (1994) ao comparar a PCR com outros testes para o diagnóstico inicial da ehrlichiose canina, concluíram que o isolamento de *E. canis* em cultura de células provou ser o método mais sensível e definitivo para o diagnóstico inicial da ehrlichiose, porém não é muito conveniente, já que o cultivo demanda muito tempo (14 a 34 dias) para obtenção de resultados positivos. Além disto, requer um nível de experiência técnica, estrutura física e equipamentos adequados o que o torna caro e dificulta o seu uso como diagnóstico de rotina.

Também são utilizados métodos de diagnóstico indireto, pela detecção de anticorpos de cada agente por meio de testes sorológicos. Estes testes são muito empregados em pesquisas epidemiológicas e para avaliação de medidas preventivas (REITER; WEILAND, 1989; GUGLIELMONE et al., 1997; PASSOS et al., 1998; SAHIBI et al., 1998; KATSANDE et al., 1999).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é uma das técnicas utilizadas no diagnóstico indireto dessas infecções detectando anticorpos séricos em animais portadores ou com infecções crônicas que mantém parasitemia baixa ou não detectável ao microscópico óptico (RISTIC et al., 1972; YAMANE et al., 1994; VERCAMMEN et al., 1995; TABOADA, 1998; AGUIAR et al., 2007b).

Wen et al. (1997) compararam a nested PCR com a RIFI para a detecção de infecção por *E. canis* em cães do Arizona e Texas tratados com doxiciclina, 37 cães que tinham sido tratados com doxiciclina deram resultados positivos na sorologia, mas, deram resultados PCR negativos, dando uma falsa impressão de que a sorologia é mais sensível do que a nested PCR. Mas os autores concluíram ser mais provável que os títulos sorológicos positivos dos cães PCR-negativos tenham sido residuais, e o tratamento com a doxiciclina tenha eliminado a maioria dos organismos de *E. canis* em aproximadamente 50% dos cães tratados. Outra possibilidade é a de que já que *E. canis* é endêmica nestes países, alguns destes cães foram positivos na sorologia devido à múltipla exposição ao antígeno mas não estavam infectados no momento, portanto, deram PCR negativos. Uma possibilidade adicional é que o resultado da PCR foi negativo devido à infecção dos cães com *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, ou cepas variantes de *E. canis*, as quais possuem reatividade cruzada na sorologia pelo uso de cepas de *E. canis* de Oklahoma como antígeno.

A técnica de “Western Immunoblotting”, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes sorológicos rápidos como o dot-ELISA também são utilizados para detecção de anticorpos contra estes agentes (MARTINOD et al., 1985; BOBADE et al., 1989; BÉLANGER et al., 2002; HARRUS et al., 2002; TORRES et al., 2002).

O Western Immunoblotting é quase tão sensível quanto a RIFI, com a vantagem da objetividade na leitura, pois não sofre influência da subjetividade do operador. No entanto, é uma técnica mais cara, que consome mais tempo e que necessita de uma tecnologia mais avançada que a RIFI (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Cadman et al. (1994) compararam o “dot-blot ELISA” com a RIFI em um estudo realizado com cães e observaram que o “dot-blot ELISA” é tão sensível e específico para a detecção de anticorpos para *E. canis* quanto a RIFI, tanto em infecções naturais quanto em experimentais. Além disso, foram observadas vantagens com seu uso, tais como a

desnecessidade de equipamentos caros, rapidez, facilidade de leitura dos resultados por pessoal inexperiente e proporcionam um registro permanente. Há “kits” comerciais baseados no princípio desta técnica (ANDEREG; PASSOS, 1999). Estes testes sorológicos são importantes no diagnóstico de ehrlichiose subclínica ou crônica, tendo em vista a baixa frequência de mórulas nesta fase (IQBAL et al., 1994; ALMOSNY, 2002).

Os testes sorológicos são técnicas simples e sensíveis, entretanto a inabilidade para distinguir uma infecção atual tanto de uma exposição prévia sem estabelecimento de infecção, quanto de uma infecção prévia é um dos maiores empecilhos deste tipo de diagnóstico (IQBAL et al., 1994; RIKIHISA et al., 1994; DAWSON et al., 1996; WEN et al., 1997). Além disto, são pouco específicos, pois pode ocorrer reação cruzada entre espécies, devendo-se associar a presença de anticorpos séricos com outros testes de diagnóstico (ANDERSON et al., 1980; YAMANE et al., 1993b; DUMLER et al., 1995; WANER et al., 2001).

A reatividade sorológica cruzada é forte entre *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (MURPHY et al., 1998; WANER et al., 2001). Há um baixo nível de reação cruzada entre *E. canis* e *A. phagocytophilum*, mas não há reação cruzada entre *E. canis* e *A. platys* (FRENCH; HARVEY, 1983; WANER et al., 2001). Podem ocorrer resultados falso-negativos também, se o antígeno não for de boa qualidade ou se o técnico for inexperiente, assim como falso-positivos, se a amostra de soro estiver contaminada por bactérias (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Da mesma forma, existem relatos de que o diagnóstico utilizando a RIFI para detecção de anticorpos de *Babesia*, também não é específico, devido à reatividade cruzada antigênica entre as espécies e ainda entre os gêneros (YAMANE et al., 1993b).

Tem ocorrido uma rápida evolução de técnicas moleculares, as quais têm permitido maior sensibilidade e detecção acurada de patógenos transmitidos por carrapatos. Embora a técnica de PCR não permita a distinção entre infecção aguda e estado portador, sua sensibilidade torna-a particularmente apropriada para o diagnóstico deste grupo de doenças (SHAW et al., 2001).

2.6.1 Diagnóstico molecular

As técnicas hoje utilizadas na genética molecular têm sido desenvolvidas a partir da pesquisa acadêmica básica, em diferentes campos da atividade científica. O trabalho de Watson e Crick em 1953, onde foi proposta a estrutura de fita-dupla do DNA, marcou a revolução molecular. Em 1977, técnicas de sequenciamento permitiram a identificação de alterações específicas na sequência de DNA e a associação destas com diferentes doenças genéticas. Depois disso, o principal marco no desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular foi a técnica da PCR, um método de multiplicação *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1987 (MOLINA; TOBO, 2004).

A PCR é uma das técnicas mais empregadas nas diversas áreas do diagnóstico molecular. A sua introdução resultou em grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma. A tecnologia da PCR também é bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (MOLINA; TOBO, 2004).

Para a realização da PCR, utiliza-se uma enzima termoestável (DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura, a saber: 94°C para desnaturação do DNA, 45°C a 70°C para hibridização dos oligonucleotídeos às sequências-alvo e 72°C para a síntese do DNA, em equipamentos chamados de

termocicladores. O DNA amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins (MOLINA; TOBO, 2004).

A PCR convencional é considerada um dos métodos de diagnóstico direto mais sensível, específico e rápido, atualmente disponível para a detecção de espécies de *Ehrlichia*, *Babesia* e *Anaplasma* caninas (IQBAL et al., 1994; ANO et al., 2001; FUKUMOTO et al., 2001; BIRKENHEUER et al., 2003; JEFFERIES et al., 2003; INOKUMA et al., 2004; DUARTE et al., 2008; PINYOOWONG et al., 2008). Sendo utilizada como teste de acompanhamento ao tratamento (PERSING et al., 1992; IQBAL et al., 1994; CHANG et al., 1997; WEN et al., 1997), na detecção de animais portadores, para caracterizar as diferentes espécies (ANDERSON et al., 1992b; DAWSON et al., 1996; DUMLER et al., 2001; DUARTE et al., 2008), e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica de patógenos (PERSING et al., 1992). No Brasil, têm sido realizados diversos estudos avaliando a prevalência de *E. canis*, com base nesta técnica (DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005; CARVALHO et al., 2008).

Outras técnicas resultantes de modificações da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo, a nested PCR (CHANG; PAN, 1996; WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998; ANO et al., 2001; MARTIN et al., 2005), seminested PCR (BIRKENHEUER et al., 2003), PCR combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (CARRET et al., 1999; INOKUMA et al., 2001b; DAGNONE et al., 2003; JEFFERIES et al., 2007), PCR multiplex (FIGUEROA et al., 1993; ALHASSAN et al., 2005; KLEDMANEE et al., 2009) e PCR em tempo real (MATSUU et al., 2005; TEGLAS et al., 2005; EDDLESTONE et al., 2006; SIRIGIREDDY et al., 2006; LABRUNA et al., 2007).

Vários trabalhos ressaltam que a utilização da nested PCR aumenta a sensibilidade da técnica no diagnóstico da ehrlichiose (IQBAL et al., 1994; Mc BRIDE et al., 1996; WEN et al., 1997). Entretanto, uma análise comparativa entre a PCR (gene *dsb*) e a nested PCR (16S rRNA), realizada em 24 amostras sanguíneas de cães naturalmente infectados por *E. canis*, demonstrou que as duas técnicas são adequadas para o diagnóstico da EMC (NAKAGHI et al., 2004). Outros alvos moleculares específicos para a identificação de sequências do DNA de *E. canis* e utilizados em PCR de etapa única, vêm demonstrando serem igualmente sensíveis e específicos em relação à técnica de nested PCR, com vantagens adicionais de reduzir resultados falsos-positivos devido à contaminação por “amplicons” da primeira etapa, além de abreviar o tempo de execução (ALVES et al., 2005; MARSILIO et al., 2006; VINASCO et al., 2007).

A sensibilidade da PCR para a detecção destes parasitos tem se mostrado melhor do que os métodos de diagnóstico microscópico e sorológico. Entretanto, as técnicas de PCR simples ainda demandam um relativo consumo de tempo, custo e requerem procedimentos complexos tais como nested PCR ou hibridização para alcançar maior sensibilidade. Portanto, há a necessidade de se desenvolver sistemas baseados na PCR visando auxiliar no diagnóstico clínico e laboratorial de hemoparasitos de forma rápida, eficiente e econômica.

2.6.2 PCR multiplex

A PCR multiplex é uma das variantes da PCR, desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra, na mesma reação, pelo uso de mais de um par de primers. O que gera economia de tempo, reagentes, uso do termociclador, custo geral e ainda, pode facilitar estudos epidemiológicos moleculares que necessitem da triagem de um grande número de potenciais vetores e populações reservatório (COURTNEY et al., 2004).

Foi descrita pela primeira vez em 1988 por Chamberlain et al., que demonstraram a aplicação da reação multiplex para o diagnóstico pré-natal e pós-natal da distrofia muscular de Duchenne.

Condições importantes para um ensaio de PCR multiplex bem sucedido são as concentrações relativas de primers, a concentração do tampão da PCR, as temperaturas de ciclagem e o balanço entre as concentrações de cloreto de magnésio e desoxirribonucleotídeos (HENEGARIU et al., 1997).

A PCR multiplex tem se tornado um ensaio de triagem rápido e conveniente tanto para a pesquisa clínica quanto laboratorial (HENEGARIU et al., 1997). Geralmente, é utilizada para aplicações de genotipagem onde a análise simultânea de múltiplos marcadores é requerida, detecção de patógenos ou organismos geneticamente modificados, ou para análise de microsátélites (polimorfismo compreendendo cópias sequenciais de, normalmente, dois, três, quatro ou cinco unidades repetidas de nucleotídeos).

É utilizada para a identificação de vários organismos tais como cepas de fungos, protozoários de vida livre e alguns vírus (FUJITA et al., 2001; MANGUIN et al., 2002; MOSQUERA et al., 2002; PELANDAKIS; PERNIN, 2002), como ferramenta para o diagnóstico diferencial entre espécies de *Plasmodium* (KHO et al., 2003; PADLEY et al., 2003), e também na detecção de agentes em carrapatos (JENKINS et al., 2001; ULLMANN et al., 2005). Estes métodos descritos são rápidos e fáceis de realizar em laboratórios de diagnóstico.

Figueroa et al. (1993) desenvolveram uma PCR multiplex altamente sensível para detectar o DNA dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (*B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*). Estes autores propuseram a utilização deste teste na detecção de animais portadores como ferramenta para análises epidemiológicas, avaliação e plano de controle em rebanhos de regiões onde estas três espécies de hemoparasitos são comumente encontradas infectando bovinos.

Alhassan et al. (2005) desenvolveram uma PCR convencional e uma PCR multiplex para a detecção simultânea de *B. caballi* e *B. equi* em sangue de equinos.

Kledmanee et al. (2009) desenvolveram uma PCR multiplex para detecção simultânea de *E. canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon canis* no sangue de cães, utilizando “primers” específicos para os seguintes genes: proteína VirB9 de *E. canis*, codificador da unidade 18S do RNA ribossomal de *Babesia* spp. e codificador da unidade 18S do RNA ribossomal de *Hepatozoon* spp.

2.6.3 O método de PCR em tempo real

Uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR que apresenta somente resultados qualitativos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Outra vantagem é que não necessita de processamento pós-PCR, ou seja, a realização da eletroforese em gel de agarose não é necessária.

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. Um sinal de fluorescência limiar é determinado e, o ponto que detecta o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção é denominado de “Cycle Threshold” (C_T), neste ponto todas as amostras podem ser comparadas, além de permitir a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. Este limiar é calculado

em função da quantidade de fluorescência base e é indicado no ponto no qual o sinal gerado da amostra é significativamente maior do que a fluorescência base. Então, o número fracionário de ciclos de PCR requeridos para gerar sinal fluorescente suficiente para alcançar este limiar, é definido como o ciclo limite, ou C_T . Os valores de C_T são diretamente proporcionais à quantidade de amostra inicial e são a base para calcular medidas dos níveis de expressão de RNA mensageiro ou número de cópias de DNA (GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Os sistemas de detecção da PCR em tempo real utilizam os fluoróforos, que são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, proporcionando o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp>, 2004).

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema óptico para a excitação da fluorescência emitida pelas moléculas e captura da emissão e um computador com um software para aquisição dos dados e análise final da reação. Estas máquinas, disponíveis de diversos fabricantes, diferem na capacidade do número de amostras, nos métodos de excitação, na sensibilidade total e nos softwares para o processamento de dados (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado, existindo dois métodos de quantificação: a detecção não-específica e a específica. Os sistemas mais utilizados são corantes intercalantes SYBR[®] Green (SCHMITTGEN et al., 2000; YIN et al., 2001) e as sondas: TaqMan (GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996) e molecular beacons (TYAGI; KRAMER, 1996). Outros métodos já foram relatados (NAZARENKO et al., 1997; WILHELM et al., 2001), entretanto, em todos os casos um sinal fluorescente é gerado durante o processo da PCR que é capturado por qualquer um dos diversos instrumentos de tempo real (GINZINGER, 2002).

O SYBR[®] Green é um método de detecção não-específica. 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. As moléculas não-ligadas (ao DNA) do SYBR[®] Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo que é subtraído durante a análise de computador. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Para demonstrar a amplificação e avaliar se foram formados produtos de PCR inespecíficos na reação, uma curva de dissociação dos fragmentos amplificados é construída. A temperatura na qual o produto amplificado se dissocia é chamada de T_m (“melting temperature”), e a este ponto, há uma queda na fluorescência decorrente do desligamento do Sybr da fita dupla do DNA representada por um pico na curva de dissociação. Se apenas os produtos específicos da PCR forem amplificados, um único pico será visualizado no gráfico representando assim, uma amplificação e uma T_m específica. No caso de uma PCR multiplex, é necessário saber de antemão a T_m de cada fragmento amplificado para que, a partir da curva de dissociação, possa ser identificado com precisão se os alvos foram amplificados.

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR[®] Green PCR Master Mix. Após o reconhecimento dos iniciadores, ocorre a polimerização catalisada por uma enzima DNA polimerase, durante a qual as moléculas do SYBR[®] Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. No ciclo

seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do corante são liberadas e há queda no sinal da fluorescência (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado em tempo real (VITZTHUM et al., 1999).

A sonda Taq Man[®], fragmento molde de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA, é 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 iniciadores, é necessário que a sonda hibridize no fragmento a ser amplificado.

O amplímero do produto da PCR deve ser pequeno, por volta de 70–150pb para desenhos utilizando sondas de hibridização e menores que 300pb para ensaios com SYBR Green (GINZINGER, 2002).

Courtney et al. (2004) descreveram um novo ensaio multiplex fluorogênico tendo os genes 23S rRNA de *Borrelia burgdorferi* e *msp2* de *A. phagocytophilum* como alvos de amplificação.

Doyle et al. (2005) desenvolveram um protocolo de PCR em tempo real no qual é possível detectar e diferenciar importantes espécies de *Ehrlichia* em uma única reação de amplificação do gene *dsb*, com satisfatória sensibilidade analítica. A técnica foi capaz de distinguir as espécies *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. canis*, detectando também coinfeções em uma mesma amostra.

Matsuu et al. (2005) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real com SYBR Green preciso, sensível e reproduzível, para a detecção quantitativa do DNA e *B. gibsoni* em amostras clínicas sanguíneas. No mesmo ano, Sirigireddy e Ganta (2005) descreveram uma PCR multiplex transcriptase reversa em tempo real para detectar infecções únicas em cães com *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* ou coinfeções com *E. canis* e *A. platys*. Em 2006, Sirigireddy et al. analisaram a utilidade deste teste molecular multiplex, como ferramenta epidemiológica para o rápido diagnóstico da presença de infecção por estes agentes em carrapatos coletados de diferentes partes do estado do Kansas.

Vinasco et al. (2007) foram os primeiros a documentar cães infectados com *E. canis* no Peru utilizando PCR convencional e uma PCR multiplex em tempo real.

Uma das limitações da PCR em tempo real é o alto custo dos equipamentos, que poderia ser compensado pela sua utilização rotineira e em diversas práticas.

2.7 Análises Filogenéticas

A filogenia é o estudo das relações evolutivas entre os organismos, que surgiu com Darwin, junto com o conceito de ancestralidade entre espécies, já a filogenia molecular surgiu com os avanços das técnicas de biologia molecular. A aplicação desses métodos logo levou ao desenvolvimento de medidas de distância genética e de montagem de árvores que expressassem as diferenças observadas entre os organismos. A grande quantidade de dados gerados e seu acúmulo a partir da década de 1970 permitiram grandes avanços na filogenia molecular. Os dados das sequências de DNA e proteínas foram utilizados para a montagem de árvores filogenéticas em organismos proximamente (homens e macacos) ou distantemente relacionados (eucarióticos, eubactéria e archaeabactéria). Portanto, os dados moleculares têm provido uma poderosa ferramenta de estudo da história evolutiva, de forma a possibilitar a reconstrução da filogenia dos maiores grupos de organismos vivos. Complementando os métodos tradicionais de classificação dos organismos, como a morfologia, fisiologia e

paleontologia. Sendo assim com a combinação dos métodos moleculares e métodos tradicionais será possível reconstruir modelos mais precisos que reflitam de forma correta as relações entre os organismos (GORAB, 2001).

A construção de uma árvore filogenética abrangente para todos os organismos é a meta dos filogeneticistas moleculares, pois o entendimento das relações entre os filos animais é de fundamental importância para compreender os modelos de evolução animal do nível genômico até o morfológico (HELFENBEIN; BOORE, 2004). Desta forma, os marcadores moleculares, que são locos gênicos variáveis utilizados para inferir padrões de diversidade espaço-temporal dos organismos, vêm sendo utilizados como uma importante ferramenta para a resolução de problemas envolvendo filogenias (BLEIDORN et al., 2003). Além disso, em muitos casos as técnicas moleculares vêm auxiliar na identificação de espécies, as quais não podem ser diferenciadas a partir unicamente de dados morfológicos (KÖHSLER et al., 2006).

2.7.1 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares além de mais seguros possuem outras vantagens em relação aos caracteres morfológicos, pois podem ser trabalhados objetivamente eliminando o problema da subjetividade, além de poderem ser obtidos em grandes quantidades e utilizados para investigar as relações filogenéticas em diversos níveis (MEYER, 1997). A utilização destes marcadores surge como uma maneira de esclarecer relações filogenéticas difíceis de abordar por outros métodos, como também uma forma de questionar visões filogenéticas propostas anteriormente (RUSSO, 2001).

Segundo Nei e Kumar (2000), a comparação de qualquer grupo de organismos é possível a partir de dados de ácidos nucleicos, pois estes apresentam semelhante composição, o que seria impossível na sistemática filogenética clássica. Além disso, estes mesmos autores indicam que como a mudança evolutiva dos caracteres moleculares pode estar associada a um padrão, é possível a utilização de modelos matemáticos para avaliar as mudanças e comparar os ácidos nucleicos de organismos menos relacionados.

Os genes RNA ribossômicos (rRNA) são conservados através de bilhões de anos de divergência evolucionária. Por isso, são normalmente utilizados para o estudo do relacionamento entre os seres vivos (WOESE; FOX, 1977). São sequências essenciais na fisiologia celular, interagindo de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. Os rRNAs são os principais produtos da transcrição em qualquer célula, constituindo geralmente de 80 a 90% da massa de RNA total dos procariontes e eucariontes (GORAB, 2001).

Na metade da década de 70, Woese et al. (1990) iniciou a montagem da base de dados de informações de sequências da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA) sobre as quais as atuais árvores universais se apóiam. O rRNA foi o escolhido como a molécula de comparação, por ter função antiga e essencial na economia celular e interações com muitos outros RNA celulares co-envolvidos e proteínas (DOOLITTLE, 1999).

Para determinar os relacionamentos de sistemas vivos existentes, abrangendo todo o espectro de maneira ótima, é necessário utilizar uma molécula de ampla distribuição. Nenhuma das proteínas já caracterizadas se adequam a este requisito. Entretanto, o RNA ribossomal se adequa. É um componente de todos os sistemas autoreplicantes, é facilmente isolado, é codificado tanto por organelas quanto por genomas procarióticos e nucleares, possui porções reduzidas e fortemente evoluídas, possui estruturas universalmente conservadas (WOESE, 1987) e sua sequência muda, mais lentamente, com permissão de tempo para detectar o parentesco entre espécies muito distantes. Até hoje, a estrutura primária do 16S (18S) RNA ribossomal tem sido caracterizada em uma coleção moderadamente

grande e variada de organismos e organelas, e a estrutura filogenética geral do domínio procariótico está começando a emergir (WOESE; FOX, 1977).

Embora sequências do gene 16S rRNA possam ser usadas rotineiramente para diferenciar e estabelecer relacionamentos entre gêneros e espécies bem definidas, espécies que recentemente divergiram podem não ser reconhecidas (FOX et al., 1992).

2.7.2 Reação de sequenciamento

O sequenciamento de DNA é uma ferramenta importantíssima para o biólogo molecular, pela qual pode ser determinada a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA amplificado, o que pode ser obtido pela clonagem do produto da PCR e pela utilização de um método de sequenciamento padrão com terminadores de cadeia ou degradação química. Métodos que sequenciam diretamente um produto de PCR, sem a necessidade de clonagem também são utilizados (BROWN, 2003).

Basicamente, dois métodos têm sido utilizados para determinar a sequência de nucleotídeos do DNA: o método enzimático de Sanger ou de terminação da cadeia com didesoxirribonucleosídeo trifosfato (SANGER et al., 1977) e o método de degradação química, desenvolvido por Maxam e Gilbert (1977). Embora o segundo método tenha tido uma ampla aplicação inicialmente, o primeiro tem sido o mais utilizado atualmente, devido à sua simplicidade e ao desenvolvimento de vetores adequados e da utilização de diferentes DNA polimerases (PASSAGLIA; ZAHA, 2003).

No método de Sanger, o DNA a ser sequenciado, que pode ser de fita simples ou de fita dupla desnaturado, é hibridizado com um oligonucleotídeo. A fita complementar é sintetizada na presença dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), de um dos didesoxirribonucleosídeos trifosfato (2',3' ddNTP), de dNTPs marcados radioativamente (α -³²P-dATP ou ³⁵S-dATP) e da *Taq* DNA polimerase. Os 2',3' ddNTPs não apresentam a hidroxila no carbono 3', de forma que, uma vez incorporados, impedem a adição de outro nucleotídeo, terminando, assim, o alongamento da cadeia. Quatro reações separadas são feitas, uma para cada ddNTP, assim, são produzidos fragmentos de vários tamanhos nos quais o ddNTP análogo está no final 3'. Após a reação, as amostras são analisadas por eletroforese para a leitura das sequências (PASSAGLIA; ZAHA, 2003).

Somente a partir do final da década de 1970, o sequenciamento de DNA rápido e eficiente tornou-se possível (BROWN, 2003). As avançadas máquinas de sequenciamento atuais podem sequenciar 96 sequências diferentes, simultaneamente, de 500-800 nucleotídeos em poucas horas. As fitas de DNA são marcadas com qualquer um dos quatro ddNTPs terminadores marcados com compostos fluorescentes, que são usados para identificar cada uma das posições dos diferentes nucleotídeos na cadeia. A reação de sequenciamento utiliza o princípio da reação em cadeia da polimerase, através de vários ciclos de anelamento dos iniciadores com o molde, extensão da cadeia de DNA (polimerização) e desnaturação, as cadeias truncadas pela incorporação dos ddNTPs específicos são produzidas. Os produtos de amplificação são então analisados no sequenciador automático (PASSAGLIA; ZAHA, 2003).

O sequenciamento genético automatizado permitiu uma grande quantidade de comparações filogenéticas moleculares de espécies (LEW; JORGENSEN, 2005).

Atualmente, árvores filogenéticas são amplamente utilizadas como modelo evolucionário aceito e são, na maioria das vezes, baseadas em sequências de aminoácidos ou de DNA, pois, entender a origem e evolução das espécies existentes e até extintas, é uma questão científica fundamental (CHOR; TULLER, 2005).

CAPÍTULO I

DELINEAMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA O DIAGNÓSTICO DOS GÊNEROS *Ehrlichia* E *Babesia* EM CÃES DOMÉSTICOS

RESUMO

LISBÔA, Raquel Silva. **Delineamento de uma PCR Multiplex para o Diagnóstico dos Gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em Cães Domésticos.** Seropédica: 2010. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

A babesiose e a ehrlichiose caninas são doenças de grande importância médico veterinária no Brasil, sendo endêmicas em todo o país. Ambas são transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que é considerado importante vetor de patógenos dos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia* e *Hepatozoon* para os cães, em diversas regiões do mundo. Os objetivos do presente estudo foram delinear uma técnica de PCR multiplex para diagnosticar simultaneamente microrganismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Babesia* em amostras de sangue de cães, desenvolver um ensaio de PCR em tempo real com SYBR[®] Green para o diagnóstico destes agentes e realizar a caracterização parcial de fragmentos do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* e do gene 18S rRNA de *Babesia* de algumas amostras detectadas positivas pela PCR. O DNA genômico total de 109 amostras de sangue foi extraído e quantificado. Destas, 30 foram selecionadas por apresentar inclusões citoplasmáticas em leucócitos sugestivas de infecção por agentes da família Anaplasmataceae, 37 por apresentar formas parasitárias de piroplasmídeos, duas por apresentar estruturas de ambos os agentes e, finalmente, 40 amostras com diagnóstico parasitológico negativo e exame hematológico sem alterações. Todas estas amostras foram testadas por PCR, para a confirmação da ausência ou presença destes hemoparasitos, para serem utilizadas no delineamento da PCR multiplex. Nas reações de PCR multiplex utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3 que amplificam um produto de aproximadamente 600pb de uma porção do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia* e os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B que amplificam um produto de aproximadamente 450pb de uma porção do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia*. Após as amplificações, 15 amostras foram purificadas e sequenciadas. As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos programas Clustal-X e MEGA-4, sendo confrontadas com sequências publicadas no GenBank, permitindo comparações filogenéticas moleculares entre espécies. As amostras também foram analisadas por uma PCR multiplex em tempo real, utilizando o reagente Power Sybr[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) e os oligonucleotídeos iniciadores 16S-f/16S-r que amplificam um fragmento de 82pb do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia* e *Babesia* Real-f/*Babesia* Real-r que amplificam um fragmento de 71pb do gene 18S rRNA das subespécies *B. canis vogeli* e *B. canis canis* e de *Babesia* sp., ambos desenhados e analisados com auxílio do programa Primer Express (Applied Biosystems[®]). A PCR multiplex foi capaz de detectar simultaneamente os dois agentes em uma amostra de DNA de um cão naturalmente coinfectado e todas as infecções individuais por *Babesia*, mas não detectou todas as infecções por *Ehrlichia*. A PCR multiplex em tempo real foi mais sensível em detectar tanto infecções únicas quanto coinfeções, além de detectar os dois agentes simultaneamente quando misturas de DNA positivo foram analisadas. Os resultados dos sequenciamentos confirmaram a identidade dos isolados, e que os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B amplificaram também, o DNA de *Hepatozoon canis*. As análises filogenéticas indicaram que as espécies de *E. canis*, *B. canis* e *H. canis* encontradas neste estudo mostraram similaridades próximas com sequências previamente depositadas no GenBank, formando grupos monofiléticos.

Palavras-chave: PCR multiplex, PCR multiplex em tempo real, Análises filogenéticas

ABSTRACT

LISBÔA, Raquel Silva. **Delineation of a PCR Multiplex to the Diagnostic of *Ehrlichia* and *Babesia* Genera in Domestic Dogs.** Seropédica: 2010. (Thesis, Doctor in Veterinary Sciences, Animal Health).

Canine babesiosis and ehrlichiosis are diseases of great medical veterinary importance in Brazil, being endemics in all the country. Both are transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* tick, which is considered the most important vector of pathogens of the *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, and *Hepatozoon* genera to the dogs, in diverse regions of the world. The objectives of the present study were to delineate a multiplex PCR technique for simultaneously detection of microorganisms of *Ehrlichia* and *Babesia* genera in canine blood samples, development of a SYBR[®] Green PCR real time assay to the diagnostic of these agents and to realize the partial characterization of fragments of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia* and 18S rRNA gene of *Babesia* of some samples detected positive by the PCR. Genomic total DNA of 109 blood samples was extracted and quantificated, of these, 30 were selected by showing cytoplasmatic inclusions in leukocytes suggesting infection by agents of the Anaplasmataceae family, 37 by showing piroplasms, two by presenting structures of both agents, and finally, 40 samples with negative parasitological diagnostic and hematological exam without alterations. All these samples were tested by PCR, to confirm the absence or presence of these hemoparasites, to be utilized in the multiplex PCR delineation. In multiplex PCR reactions the primers A17/EC3 were used to amplify an approximately 600bp region of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia* species and the primers PIRO-A1/PIRO-B were used to amplify an approximately 450bp region of the 18S rRNA gene of *Babesia* species. After the amplifications, 15 samples were purified and sequenced. The sequences obtained were analyzed using Clustal-X and MEGA-4 softwares, being confronted with pulished sequences in GenBank, permitting molecular phylogenetic comparisons between species. The samples were analyzed by a real-time multiplex PCR too, utilizing the Power Sybr[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) reagent and the primers 16S-f/16S-r that amplify a fragment of 82bp of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia* species and Babesia Real-f/Babesia Real-r that amplify a fragment of 71bp of the 18S rRNA gene of *B. canis vogeli* and *B. canis canis* subspecies, and of *Babesia* sp., both were designed an analyzed by Primer Express Software (Applied Biosystems[®]). The multiplex PCR was able to simultaneously detect both agents in a DNA sample of a dog naturally co-infected and all the single infections by *Babesia*, but does not detected all the *Ehrlichia* infections. The real-time multiplex PCR was more sensitive in detect both single and co-infections, as well as simultaneously detection of the two agents when positive DNA mixtures were evaluated. The sequencing results confirmed the isolates identity, and that the primers PIRO-A1/PIRO-B also amplified the DNA of *Hepatozoon canis*. Phylogenetic analysis indicated that *E. canis*, *B. canis* and *H. canis* species found in this study showed close similarities with sequences previously deposited in GenBank, forming monophyletic groups.

Key words: Multiplex PCR, Real-time multiplex PCR, Phylogentic analysis.

1 INTRODUÇÃO

Os hemoparasitos caninos causam doenças fatais em cães do mundo todo. A distribuição geográfica do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, em regiões tropicais e subtropicais pode levar à ocorrência de muitas doenças graves transmitidas por este aos cães, tais como a babesiose, ehrlichiose e hepatozoonose.

A ehrlichiose canina é uma doença importante e potencialmente fatal causada pela rickettsia intracelular *Ehrlichia canis*, que normalmente parasita células sanguíneas mononucleares. A ehrlichiose crônica está associada à destruição irreversível da medula óssea. Apesar de muitas espécies da Família Anaplasmataceae infectarem os cães (*Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys*; *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia risticii*), *E. canis* permanece como o agente mais conhecido.

A babesiose canina é causada pelos hemoprotozoários do gênero *Babesia*, mais comumente por *Babesia gibsoni* e *B. canis*. É uma doença febril e hemolítica caracterizada pela infecção nos eritrócitos circulantes, sendo considerada endêmica no Brasil.

Em cães, a coinfeção com *Ehrlichia*, *Babesia* e *Hepatozoon* ocorre em áreas endêmicas e isto pode explicar, parcialmente, as variações na apresentação clínica, patogenicidade e resposta ao tratamento.

A detecção microscópica de hemoparasitos ocorre mais na fase aguda do que nas fases subclínica ou crônica, além disso, não permite a diferenciação intra-específica. Os testes sorológicos, tais como a reação de imunofluorescência indireta e dot-ELISA, são muito sensíveis em detectar a prevalência da exposição a parasitos ou reação cruzada com outras espécies, mas podem induzir ao erro especialmente em áreas onde estas doenças são endêmicas. Além disso, não são úteis para determinar o estado de infecção atual ou avaliar a eliminação dos parasitos após a quimioterapia.

Cada infecção requer um tratamento específico, então o diagnóstico acurado é necessário para o tratamento correto. Com o intuito de se realizar um diagnóstico mais preciso e rápido, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos para a detecção direta destes microrganismos.

Tem ocorrido uma rápida evolução de técnicas moleculares, as quais têm permitido maior sensibilidade e detecção acurada destes patógenos transmitidos por carrapatos. A PCR é considerada um dos métodos de diagnóstico direto mais sensível, específico e rápido, atualmente disponível para a detecção de espécies de *Ehrlichia* e *Babesia* caninas. Diversas técnicas resultantes de modificações da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia.

A PCR multiplex é uma variante da PCR na qual dois ou mais alvos são amplificados simultaneamente na mesma reação pelo uso de mais de um par de oligonucleotídeos. É um ensaio de triagem rápido e conveniente tanto para a pesquisa clínica quanto laboratorial e, tem sido utilizada como ferramenta para o diagnóstico diferencial entre espécies e detecção de coinfeções e de agentes em carrapatos.

Com este intuito, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: 1- Delinear uma técnica de PCR multiplex para diagnosticar, simultaneamente infecções por *Babesia* e *Ehrlichia*; 2- Desenvolver um ensaio de PCR em tempo real utilizando SYBR[®] Green para o diagnóstico destes agentes; 3- Realizar a caracterização parcial de fragmentos do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* e do gene 18S rRNA de *Babesia* de algumas amostras positivas pela PCR neste estudo e, comparar as sequências dos fragmentos obtidos com as sequências apresentadas previamente no GenBank.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedência e Seleção das Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue total provenientes da rotina de dois laboratórios localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, durante o período de junho de 2007 a fevereiro de 2008. Estas amostras foram coletadas de cães de diferentes raças e idade, por meio de venopunção radial, acondicionadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e mantidas sob refrigeração a 4°C até o processamento de seu hemograma completo, realizado sempre no mesmo dia da coleta.

As amostras foram selecionadas com base nos seguintes critérios: apresentar em seu diagnóstico parasitológico por meio de exame de esfregaços sanguíneos, inclusões citoplasmáticas (e/ou mórulas) em leucócitos (Figura 1) sugestivas de infecção por agentes da família Anaplasmataceae, pertencentes ao gênero *Ehrlichia* e/ou estruturas intraeritrocitárias típicas de piroplasmídeos (Figura 2).

De um total de 109 amostras selecionado, 30 apresentaram inclusões citoplasmáticas em leucócitos sendo identificadas como a letra E, 37 apresentaram formas parasitárias de piroplasmídeos sendo identificadas como 1B a 37B e duas amostras apresentaram estruturas de ambos os agentes sendo identificadas como M1 e M2. A amostra M1 também apresentou gametócitos de *Hepatozoon*. Os resultados dos hemogramas de todas essas amostras apresentaram alterações hematológicas típicas de infecções por estes hemoparasitos, tais como: anemia, trombocitopenia e leucopenia. As 40 amostras restantes foram selecionadas por apresentar diagnóstico parasitológico negativo e exame hematológico sem alterações. Estas amostras foram identificadas como 1N a 40N.

Todas as amostras foram armazenadas em tubos “eppendorf” e mantidas em “freezer” a -20°C na Estação Experimental Parasitológica W. O. NEITZ do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).



Figura 1. Seta indicando mórula de *Ehrlichia* em monócito de cão, em esfregaço de sangue corado com Giemsa (1.000X).



Figura 2. Seta indicando formas parasitárias de *Babesia* em eritrócito de cão, em esfregaço de sangue periférico corado com Giemsa (1.000X).

2.2 Locais de Execução dos Ensaios

Os ensaios foram realizados na EMBRAPA Gado de Corte, no Laboratório de Biologia Molecular, da área de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) do município de Campo Grande-MS e na UFRRJ, no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular e no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental Parasitológica W. O. NEITZ, ambos do Departamento de Parasitologia Animal.

No laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Instituto de Agronomia da UFRRJ foram realizadas as análises de PCR multiplex em tempo real.

2.3 Extração e Quantificação do Material Genômico (DNA)

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo elaborado por Sambrook e Russel (2001), com modificações (Anexo A). Todos os reagentes utilizados no processo de extração foram da marca SIGMA[®].

A extração foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,7% (Invitrogen[®]). Foram aplicados 1 μ l de cada DNA, 7 μ l de água ultrapura estéril e 2 μ l de tampão da amostra do tipo III (6X) (SAMBROOK et al., 1989) por canaleta do gel. Na primeira canaleta de cada gel era colocado o padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]). A corrida eletroforética foi realizada em tampão tris – EDTA – acetato, pH 8,0 (TAE – 1X). Os géis foram corados com brometo de etídio 5 μ g/ μ L (Sigma[®]) por 10 minutos, visualizados sob luz ultravioleta (U.V.) em transiluminador e fotografados com auxílio de máquina fotográfica digital interligada ao sistema AlphaDigidoc[®] (Gel Documentation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

A quantificação do DNA total foi feita em espectrofotômetro (Biorad[®]). A leitura a 260nm de absorbância (A_{260nm}) medida sob comprimento de onda de luz U.V. permite o cálculo da concentração dos ácidos nucleicos na amostra. Uma Densidade óptica (DO) de 1 corresponde aproximadamente a 50 μ g/ml⁻¹ para DNA fita dupla. A relação entre A_{260nm} e A_{280nm} (DO_{260}/DO_{280}) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. As amostras de DNA foram diluídas em água do tipo Mili-Q na razão de (1:100). A concentração foi determinada pela mensuração em 260nm contra um branco e depois calculada via um fator ($A_{260nm} \times QF/\text{fator de diluição} = \mu\text{g/mL}$, onde $QF=50$ para DNA fita dupla).

Outro aparelho utilizado para quantificar os DNAs foi o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (PeqLab[®]). Este aparelho mede 1 μ L da amostra com alta precisão e

reprodutibilidade, utilizando uma tecnologia patenteada de retenção da amostra que utiliza apenas a superfície de tensão para reter a amostra. Além disso, possui a capacidade de medir amostras altamente concentradas sem diluição (50X mais concentradas do que as amostras medidas por uma cubeta padrão de espectrofotômetro).

Os resultados das quantificações do DNA total de cada amostra estão apresentados no Anexo B. Com base nas concentrações obtidas das quantificações, foram preparadas alíquotas de 20µL diluídas com água ultrapura estéril, em uma concentração final estimada de aproximadamente 12,5ng/µL.

2.4 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA extraído de cada amostra foi primeiramente testado para a presença de sequências genéticas de agentes da família Anaplasmataceae e de *Babesia*.

2.4.1 Seleção dos genes alvo

Realizou-se a escolha do gene codificador da unidade 16S do RNA ribossomal (gene 16S rRNA) e do gene 18S rRNA baseado em buscas na literatura sobre estudos de espécies de *Ehrlichia* (DAWSON et al., 1994; DUMLER et al., 2001) e *Babesia* (KJEMTRUP et al., 2000), respectivamente. Os referidos genes têm importância em estudos filogenéticos por se tratarem de genes altamente conservados.

2.4.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de espécies do gênero *Ehrlichia*

Para a PCR de *Ehrlichia* foram utilizados o oligonucleotídeo bacteriano universal A17 (5'-GTTTGATCATGGCTCAG-3'), que corresponde a uma região conservada próxima do final 5' e o oligonucleotídeo EC3 (5'-TTAAAAGCCGCTCCAAA-3') que é direcionado para uma região variável dentro do gene 16S rRNA. Este par de oligonucleotídeos iniciadores amplifica um produto de aproximadamente 600pb (INOKUMA et al., 2002) de algumas espécies do gênero *Ehrlichia* (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris* e *E. ovina*).

2.4.3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de espécies do gênero *Babesia*

Um novo par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado pela Dra. Carina Elisei de Oliveira (EMBRAPA Gado de Corte – MS), com auxílio do programa Primer perfect (<http://www.Invitrogen.com>) e com base em sequências do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia* disponíveis no GenBank, denominados RBC-f (5'-TTACGGTGAAACTGCGAATGG-3') (universal) e RBC-r (5'-TTACAAAATCAATCCCCGTCAC-3') (*B. gibsoni*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*), os quais amplificam um produto de aproximadamente 1.402pb.

Também foi testado outro par de oligonucleotídeos iniciadores universais, denominados PIRO-A1 (5'-AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC-3') e PIRO-B (5'-TTAAATACGAATGCCCAAC-3') que amplificam uma região de aproximadamente 450pb do gene 18S rRNA de piroplasmídeos (FÖLDVÁRI et al., 2005). O oligo senso PIRO-A1 foi desenvolvido por Muhlneckel et al. (2002) para amplificar a maioria das espécies de *Babesia* utilizando a informação de sequências do GenBank. O oligo reverso PIRO-B foi descrito previamente por Olmeda et al. (1997) para amplificar espécies de *Babesia*.

As sequências iniciadoras ou oligonucleotídeos utilizados e outros dados estão resumidos no Quadro 3.

Quadro 3. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação parcial dos genes 16S rRNA e 18S rRNA, com a descrição dos tamanhos dos amplicons e suas respectivas referências.

Agente	Iniciadores	Sequências dos oligonucleotídeos (5'-3')	Fragmento esperado (pb)	Referência
<i>Ehrlichia</i>	A17	GTTTGATCATGGCTCAG	600	Iqbal et al., 1994.
	EC3	TTAAAAGCCGCTCCAAA		
<i>Babesia</i>	RBC-f	TTACGGTGAAACTGCGAATGG	1.402	Dra. Carina Elisei (EMBRAPA Gado de Corte)
	RBC-r	TTACAAAAATCAATCCCCGTCAC		
<i>Babesia</i>	PIRO-A1	AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC	450	Földvári et al., 2005.
	PIRO-B	TTAAATACGAATGCCCCAAC		

2.4.4 Controles negativos e positivos das reações de PCR

Para verificar a presença de contaminação dos reagentes, enzimas e água ultrapura utilizados foi incluído, em cada reação, um tubo contendo todos os componentes da PCR exceto a amostra de DNA, sendo adicionada em seu lugar uma quantidade equivalente de água ultrapura.

Como controles positivos utilizou-se o DNA do isolado da amostra-padrão de Jaboticabal isolada de um caso de ehrlichiose canina em 1993 por Machado (CASTRO et al., 2004), mantido em cultura de células da linhagem DH82, e o DNA de *B. canis* proveniente do isolado Jaboticabal cedidos gentilmente pela professora Dra. Rosângela Zacarias Machado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Jaboticabal.

2.4.5 Preparo do mix para as reações de PCR e descrição das sequências térmicas utilizadas

As reações de PCR foram preparadas sempre adicionando 2,5µL de tampão de PCR 10x (100mM Tris-HCl, pH 8,5 e 500mM KCl) e 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP) (Ludwig-Biotec®). Água ultrapura estéril era acrescentada para completar o volume final de 25µL.

As concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Ludwig Biotec®), de iniciadores, de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec®) e a quantidade de DNA genômico utilizada para cada reação estão apresentadas na Tabela 1.

Para a determinação das melhores condições de desempenho de cada PCR, realizaram-se testes utilizando diferentes concentrações dos oligonucleotídeos (0,16µM, 0,2µM, 0,3µM, 40,µM, 0,6µM, 0,8µM e 1,0µM), gradiente de temperatura de anelamento e concentração de cloreto de magnésio (1,0mM, 1,5mM e 2,0mM).

Tabela 1. Descrição das concentrações de cloreto de magnésio, dos oligonucleotídeos iniciadores, de *Taq* DNA polimerase e quantidade de DNA genômico utilizada em cada reação de PCR.

Oligonucleotídeos Iniciadores	Concentrações em 25µL/amostra			DNA genômico
	Cloreto de Magnésio	Iniciadores	<i>Taq</i> DNA polimerase	
A17/EC3	2,0mM	1,0µM (Invitrogen®)	1,5U	2µL
RBC-f/RBC-r	1,5mM	0,2µM (Promega®)	1,5U	1µL
PIRO-A1/PIRO-B	1,5/2,0mM	0,3µM (Invitrogen®)	0,75U	2-3µL (≈25 a 37,5ng)

Os oligonucleotídeos A17/EC3 e PIRO-A1/PIRO-B foram os selecionados para a triagem de todas as amostras (109) por terem apresentado resultados melhores. Ambos amplificaram apenas uma banda do tamanho esperado, sendo estes fragmentos amplificados para cada espécie, facilmente identificados por seus tamanhos diferentes (450pb e 600pb).

As concentrações, destes dois pares de oligonucleotídeos, utilizadas para o preparo das misturas de PCR, assim como a programação de amplificação diferiram, em alguns pontos, das utilizadas por seus respectivos autores. No artigo original do par de oligonucleotídeos A17/EC3 (IQBAL et al., 1994), os autores citam apenas qual a concentração dos oligonucleotídeos (50pmol de cada primer) e não informam nada sobre as concentrações dos outros reagentes na reação. Além disso, por ser um artigo antigo, as condições de ciclagem eram diferentes do utilizado atualmente, não eram utilizados os passos de desnaturação inicial e extensão final. Portanto, após alguns testes, variando tempos e temperaturas, as sequências térmicas foram estabelecidas, sendo que, apenas o número de ciclos, a temperatura de anelamento e a temperatura de extensão foram mantidas iguais às originais do artigo. Já para o par de oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B, os autores (FÖLDVÁRI et al., 2005) descreveram todas as condições da reação. Após os testes realizados, variando tempos e temperaturas, no presente trabalho o que variou com relação ao artigo original foram as concentrações dos oligonucleotídeos, o tempo de desnaturação inicial e o número de ciclos.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf® ou Axygen®) e suas sequências térmicas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Programas de amplificação utilizados, para a identificação das sequências genéticas dos gêneros *Ehrlichia* e *Babesia*, para cada par de oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeos - Agente	Sequências térmicas
A17/EC3 – <i>Ehrlichia</i>	94°C por 5 minutos 30 ciclos: 1 min. a 94°C, 30 seg. a 60°C e 45 seg. a 72°C 72°C por 5 minutos
RBC-f/ RBC-r- <i>Babesia</i>	94°C por 3 minutos 35 ciclos: 1 min. a 94°C, 1 min. a 57,8°C e 1,5 min. a 72°C 72°C por 7 minutos
PIRO-A1/PIRO-B – <i>Babesia</i>	94°C por 5 minutos 30 ciclos: 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 60°C e 30 seg. a 72°C 72°C por 5 minutos

2.5 Sensibilidade Analítica das PCRs

Para determinar o limiar de detecção das PCRs simples realizadas com os oligonucleotídeos A17/EC3 e PIRO-A1/PIRO-B, os DNAs controles positivos para *Ehrlichia* e *Babesia* (amostras de Jaboticabal) foram utilizados para a preparação de diluições seriadas de razão 10, até 10⁻⁹.

As PCRs, com cada par de oligonucleotídeos, foram realizadas utilizando 5µL do DNA controle positivo e dos DNAs diluídos de cada respectivo agente, utilizando-se as reações e condições de amplificação descritas para cada oligonucleotídeo no item 2.4.6.

2.6 PCR Multiplex para a Detecção Simultânea de *Ehrlichia* e *Babesia*

Para o desenvolvimento da PCR multiplex, foram eleitos os mesmos oligonucleotídeos utilizados na triagem das amostras (A17/EC3 e PIRO-A1/PIRO-B). Foram realizados testes com diferentes concentrações e proporções entre os dois pares de oligonucleotídeos (0,15µM, 0,3µM, 1,0µM, 1,5µM e 2,0µM), tampão da PCR (1X e 2X), dNTPs e MgCl₂ (1,5mM, 2,0mM e 2,5mM), para a otimização da reação de PCR. Testou-se também a utilização de glicerol a 5% autoclavado (v/v, na concentração final), sendo o volume final ajustado com a água.

A reação da PCR foi preparada utilizando o tampão na concentração 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl - pH 8,5) (Ludwig-Biotec[®]), 2,5mM de MgCl₂, 0,4mM de cada dNTP (Ludwig-Biotec[®]), 0,15µM de cada oligonucleotídeo iniciador para amplificação do gênero *Babesia* (PIRO-A1/PIRO-B), 1,5µM ou 2µM de cada oligonucleotídeo iniciador para amplificação do gênero *Ehrlichia* (A17/EC3), 3,0U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig-Biotec[®]), 12µL da amostra de DNA, em um volume final de 50µL completado com água ultrapura estéril.

As amplificações foram realizadas em termociclador programado para as mesmas temperaturas e ciclos citados na Tabela 2 para a PCR de *Ehrlichia* com o par de oligonucleotídeos A17/EC3. Porque esta sequência térmica apresentou ótimos resultados na amplificação tanto de *Ehrlichia* quanto de *Babesia*.

Além das 109 amostras, foram testadas misturas de DNA positivo para *Ehrlichia* com DNA positivo para *Babesia*, em diferentes proporções (µL).

2.7 Cuidados para Evitar Contaminação

Para evitar problemas de contaminação, os processos de extração do DNA a partir de sangue total, preparo da mistura da PCR, eletroforese em gel de agarose e revelação dos resultados foram realizados em ambientes diferentes. Além disso, o preparo da mistura da PCR foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (Trox[®] technik) utilizando um conjunto diferente de pipetas de precisão e de ponteiras descartáveis com filtro e estéreis (Axygen[®]).

2.8 Visualização dos Produtos Amplificados

Todos os produtos amplificados gerados nas reações de PCR e PCR multiplex foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen[®]), em cuba horizontal, por aproximadamente uma hora a 90 volts em fonte de alimentação de energia 'Power Pac Universal' para eletroforese e sistema de transferência (Biorad[®]), com tampão TAE (1X) como fluido condutor de corrida. Foram aplicados 5µl ou 8µl do produto da amplificação junto com 1µl ou 2µl de tampão da amostra do tipo III (6X), respectivamente, por canaleta do gel. Na primeira canaleta de cada gel foi adicionado um padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]) ou Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec[®]).

A concentração de agarose participa de modo importante na separação eletroforética, porque é ela que determina a faixa de tamanho das moléculas de DNA que podem ser separadas. As concentrações do gel de agarose utilizadas para cada PCR estão listadas na Tabela 3. Foram utilizadas as concentrações indicadas pelos respectivos autores (Quadro 3). Para o par de oligonucleotídeos descritos nesta tese (RBC-f/RBC-r), a concentração do gel de agarose foi determinada com base nas relações entre concentração de agarose e resolução de moléculas lineares de DNA (SAMBROOK et al., 1989).

Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 5µg/µL (Sigma[®]) ou Sybr Gold na diluição de 1:10 (Invitrogen[®]) por 10 a 15 minutos, visualizados e fotografados sob luz U.V. em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia[®]).

Tabela 3. Concentração da agarose utilizada no preparo do gel de eletroforese para cada PCR.

PCR	Concentrações do gel de agarose
A17/EC3 – <i>Ehrlichia</i>	1%
PIRO-A1/PIRO-B – <i>Babesia</i>	1%
RBC-f/ RBC-r- <i>Babesia</i>	0,8%
PCR multiplex	1% a 1,5%

2.9 Sequenciamento de Amplicons Obtidos com os Oligonucleotídeos Iniciadores A17/EC3, RBC-f/RBC-r e PIRO-A1/PIRO-B

Algumas amostras amplificadas pela PCR neste estudo foram sequenciadas. Como segue: quatro amostras amplificadas pelos oligonucleotídeos A17/EC3 (11E, 19E, 20E e M2), sete amostras amplificadas pelos oligonucleotídeos RBC-f/RBC-r (1B, 2B, 3B, 4B, 10B, 16B

e banda inespecífica da 32B) e quatro amostras amplificadas pelos oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B (9B, 12B, M1 e M2).

2.9.1 Extração, purificação e quantificação dos amplicons do gel de agarose

Após as reações de PCR com os oligonucleotídeos A17/EC3, RBC-f/RBC-r e PIRO-A1/PIRO-B, as bandas referentes a cada amplicono foram visualizadas sob luz U.V e cortadas do gel de agarose 1% com lâmina de bisturi estéril, utilizando máscara de proteção anti-U.V.

Utilizou-se o protocolo de purificação de bandas cortadas do gel de agarose desenvolvido e utilizado na FioCruz de Curitiba-PR. Este protocolo usa acetato de sódio (0,3M; pH 5,2) combinado com o tempo e velocidade de centrifugação a 0-4°C. Segundo recomendado por Sambrook et al. (1989), este cátion monovalente é utilizado na maioria das rotinas de precipitação de DNA e RNA. Pontas de ponteiras com filtro de 1mL foram cortadas e encaixadas em tubos de polipropileno de 1,5mL devidamente identificados; os filtros foram lavados com água mili-Q por 3 vezes ou mais e colocados sob luz U.V.; as bandas de interesse foram cortadas do gel de agarose colocadas em cima dos filtros e os tubos centrifugados a 6.000x g (8.000rpm) por 20 minutos; acrescentou-se acetato de sódio para atingir uma concentração de 0,3M ao líquido que foi filtrado para o fundo dos tubos, 1µL de glicogênio (20mg/mL) (Invitrogen®) como carreador, para melhorar a precipitação do DNA, e 2 volumes de etanol absoluto (sobre o volume total); deixou-se descansar a -20°C “overnight”. Após, as amostras foram centrifugadas a 13.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado; 1mL de etanol 70% foi adicionado para a lavagem do “pellet” de DNA e os tubos centrifugados a 13.000rpm por 30 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado novamente e os tubos foram deixados secar à temperatura ambiente. Os DNAs foram ressuspensos em 5 a 20µL de água ultrapura.

O glicogênio é comumente utilizado para precipitação de DNA (NOBREGA; GUEDES, 2005).

Cada amostra extraída e purificada do gel foi então submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose a 2% (1µL de cada purificação), para verificar seu rendimento e quantificar. Um padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®) ou Low DNA Mass Ladder de 100 a 2.000pb (Invitrogen®) foi adicionado na primeira canaleta de cada gel analisado para se obter uma medida comparativa das quantidades de DNA das amostras. Algumas destas purificações foram também quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (PeqLab®) e cada concentração foi devidamente anotada para uso posterior na reação de sequenciamento (Anexo C).

2.9.2 Reações de sequenciamento

Na Tabela 4 estão apresentadas as amostras que foram purificadas, com os respectivos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento e o local onde o sequenciamento foi realizado.

Tabela 4. Amostras amplificadas pela PCR que foram sequenciadas, indicando seus respectivos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento e o local onde o mesmo foi realizado.

Amostras	Oligonucleotídeos	Sequenciamento
1B, 2B, 3B, 4B, 10B, 16B e 32B (banda inespecífica)	RBC-f	Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre)
9B e 12B	PIRO-B	
11E, 19E, 20E e M2	A17 e EC3	Laboratório de Genoma (EMBRAPA Agrobiologia – Seropédica, RJ.)
M1 e M2	PIRO-A1 e PIRO-B	

No sequenciamento realizado no Laboratório ACTGene foi utilizado o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50cm e polímero POP6 (Applied Biosystems®). Os DNAs-molde (30 a 45ng) foram marcados utilizando-se 3,2pmol de cada respectivo oligonucleotídeo (Quadro 3) e 2µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems®) em um volume final de 10µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems®). Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems®) com os parâmetros *Dye Set “Z”*; *Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”*; *BioLIMS Project “3100_Project1”*; *Run Module 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”*; e *Analysis Module 1 “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”*.

As outras cinco amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (MegaBACE 1000, Amersham Life Science) no Laboratório de Genoma da EMBRAPA Agrobiologia – Seropédica, RJ.

2.10 Análise dos Resultados Obtidos no Sequenciamento

2.10.1 Montagem das sequências consenso

As sequências (senso e antisenso) brutas obtidas do sequenciador foram inicialmente alinhadas utilizando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e o alinhamento foi corrigido manualmente utilizando o programa MEGA versão 4 (“Phylogenetic and Molecular Evolutionary Analyses-MEGA version 4.0”) (TAMURA et al., 2007) para a obtenção das sequências consenso das regiões 16S e 18S rRNA de *Ehrlichia* sp.e *Babesia* sp., respectivamente. Isto foi realizado apenas com as amostras que foram sequenciadas com os dois oligonucleotídeos obtendo-se sequências senso e sequências antisenso (sequenciamento realizado no Laboratório de Genoma da EMBRAPA Agrobiologia).

2.10.2 Busca em bancos de dados público mundial e alinhamento múltiplo de sequências

As sequências consenso e as sequências únicas foram então submetidas a uma busca no GenBank (BENSON et al., 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para consulta de similaridade de nucleotídeos por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), para comparação com sequências homólogas já depositadas no referido banco de dados.

Foram escolhidas sequências comuns às amostras, considerando-se as porcentagens de identidades mais altas e valores-e menores (e-value, ideal=0). Todas as sequências obtidas pelo sequenciamento e as escolhidas pelo BLAST foram salvas em modo “FASTA” e alinhadas com auxílio do programa MEGA4. Após os alinhamentos, as sequências de diferentes tamanhos foram reduzidas para a região onde todas alinharam.

Foi realizado um total de três alinhamentos, sendo utilizadas no primeiro dez sequências de espécies de *Ehrlichia* (*E. canis* Taiwan isolada de um gato, EU178797; *E. canis* Espanha, AY394465; *E. canis* Brasil-CO1, EF195134; *E. canis* Brasil-CO2, EF195135; *Ehrlichia* sp. África do Sul, U54805; *E. ovina* Turquia, AF318946; *E. chaffeensis* Arkansas, AF416764; *E. ewingii* Georgia, M73227; *E. muris*, U15527 e *E. ruminantium* África do Sul, DQ482915) junto com a sequência da amostra M2 e *Neorickettsia sennetsu* (M73225) como grupo externo. No segundo alinhamento, onze sequências de espécies de *Babesia* (*B. canis vogeli* Argentina, EU362994; *B. canis vogeli* Venezuela, *B. canis vogeli* Sudão, DQ111760; DQ297390; *B. canis canis* Rússia, AY649326; *B. canis canis* Croácia, AY072926; *B. gibsoni* Japão, AB478320; *B. odocoilei* U16369; *B. divergens* Texas, U16370; *B. caballi* Z15104; *B. bigemina* X59607 e *B. bovis* L19078) e cinco sequências de espécies de *Hepatozoon* (*H. canis* Brasil, DQ071888; *H. canis* Espanha-1, AY150067; *H. canis* Brasil, AY461375; *Hepatozoon* sp. Brasil, AY864678 e *H. americanum* Oklahoma, AF176836) junto com as sequências das amostras 1B, 2B, 4B, 9B, 10B, 12B e 16B e as sequências consenso das amostras M1 e M2. Por fim, um terceiro alinhamento foi realizado com todas estas sequências juntas. As amostras 11E, 19E, 20E, 3B e 32B não puderam ser incluídas nesta análise por serem muito curtas.

Como a maioria das sequências de 16S e 18S rRNA presentes GenBank não são completas, foram utilizadas apenas sequências que puderam ser alinhadas com os fragmentos sequenciados no presente trabalho.

2.10.3 Construção das árvores filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas no MEGA-4. Os alinhamentos salvos foram convertidos em modo “.meg” para a formação das árvores filogenéticas. Utilizou-se o método de construção da árvore “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987), utilizando o teste de confiança “bootstrap” com 1.000 repetições. Os ramos correspondentes a separações produzidas em menos de 50% das repetições de “bootstrap” foram colabados. As distâncias evolucionárias foram calculadas com o método Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980). A taxa de variação entre os sítios foi modelada com distribuição de gama. Todas as posições contendo “gaps” e ausência de dados foram eliminadas do grupo de dados (opção “complete deletion”).

As novas sequências consenso obtidas serão enviadas para o Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) para posterior publicação.

2.11 PCR Multiplex em Tempo Real

Para o delineamento da PCR multiplex em tempo real, novos oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e analisados com auxílio do programa Primer Express (Applied Biosystems®). Os números de acesso das sequências dos genes 18S rRNA de *B. canis vogeli* e 16S rRNA de *Ehrlichia canis* utilizadas para desenhar os oligonucleotídeos foram DQ297390 (na posição 173-243) e EU123923 (na posição 1.106-1.187), respectivamente. Estas sequências foram escolhidas por terem apresentado maiores porcentagens de identidade com as amostras sequenciadas neste estudo.

O par de oligos desenhado para amplificar um fragmento de 82pb do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia* (*E. canis*, *Ehrlichia* sp., *E. ruminantium*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e

E. muris) foram nomeados 16S-f (5'-TCAGCTCGTGTCGTGAGATGT-3') e 16S-r (5'-GCCAGCATTACCTGTTGGT-3') e o outro par, desenhado para amplificar um fragmento de 71pb do gene 18S rRNA das subespécies *B. canis vogeli* e *B. canis canis* e de *Babesia* sp. foram nomeados Babesia Real-f (5'-CTTTTGACCGCGTTTATTAGTTTG-3') e Babesia Real-r (5'-TGCGATTCGCCAGTTTATTATG-3).

Inicialmente, cada par de oligonucleotídeos foi testado em reação de PCR simples, como segue: tampão 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl - pH 8,5) (Ludwig-Biotec[®]), 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (Ludwig-Biotec[®]), 1,4μL de cada oligonucleotídeo iniciador (16S-f/16S-r na reação para *Ehrlichia* e Babesia Real-f/Babesia Real-r para *Babesia*) diluídos na concentração final de 3,6μM (Invitrogen[®]), 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig-Biotec[®]), 3μL da amostra de DNA (amostra 1E para o gene 16S rRNA e amostra 17B para o gene 18S rRNA), em um volume final de 25μL completado com água ultrapura estéril (Ludwig-Biotec[®]).

O programa de amplificação para ambas as reações, consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 20 segundos e, uma extensão final a 72°C por 4 minutos em termociclador (Axygen[®]). Os resultados foram visualizados após separação dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 2,5%.

As amostras testadas na PCR multiplex em tempo real foram os controles positivos (*E. canis* e *B. canis* – Jaboticabal), as amostras 1 a 40E, 1 a 37B, M1, M2, 1 a 14N e 30N, e ainda, algumas reações foram realizadas com misturas de DNA positivos para *Ehrlichia* e *Babesia*.

As reações de PCR multiplex em tempo real foram preparadas em tubos de reação MicroAmp[®] Fast com tampa (Applied Biosystems[®]) e em placa de 96 poços MicroAmp[™] Fast Optical Reaction (Applied Biosystems[®]) e realizadas com PCR “hot-start”, utilizando o reagente Power Sybr[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) em aparelho StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®]). O mix de cada reação foi de 12μl contendo: 6μl Power Sybr[®] Green PCR Master Mix (1X), 3μl de oligonucleotídeos (misturados na concentração final de 0,9μM) e 3μl de DNA total (≈32,5ng).

O programa de amplificação teve um passo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com a seguinte programação: desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento - extensão a 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, uma curva de dissociação dos fragmentos amplificados (“melting curve”) foi obtida para visualização da especificidade de amplificação. Nesta etapa a amostra foi aquecida gradativamente de 60°C a 95°C com intervalos de 0,2°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração e Quantificação do DNA total

O DNA total de 109 amostras sanguíneas de cães com diagnóstico positivo e negativo para presença de hemoparasitos, por meio de esfregaços sanguíneos, foi extraído. A Figura 3 mostra o resultado da extração do DNA de algumas das amostras de sangue, demonstrando a eficiência do protocolo de extração utilizado.

A determinação da concentração do DNA molde é muito importante para a padronização da técnica de PCR nos experimentos, por este motivo, os DNAs extraídos foram quantificados. Porém, deve-se levar em consideração que o resultado desta quantificação é superestimado, pois, o que está sendo quantificado é uma mistura do DNA do parasito com o do hospedeiro.

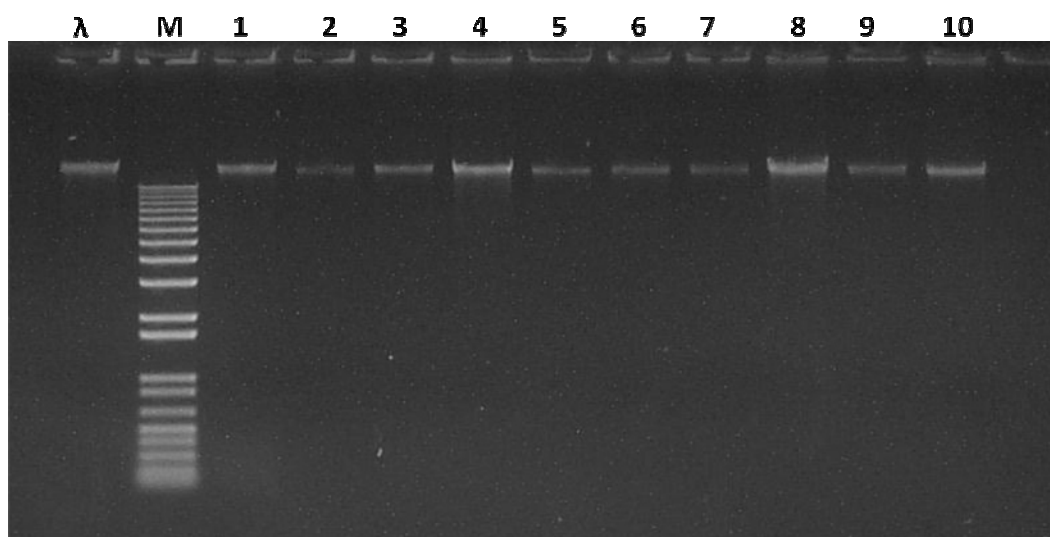


Figura 3. Extratos de DNA total obtidos de amostras de sangue de cães. [λ]: 250ng de lambda DNA (Invitrogen®), [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®) e [1-10]: DNA total dos cães detectados positivos para *Babesia* por meio do esfregaço sanguíneo (amostras 12B, 13B, 14B, 16B, 17B, 18B, 19B, 20B, 30B e 31B).

3.2 Amplificação com os Oligonucleotídeos RBC-f/RBC-r – *Babesia*

Apenas os extratos de DNA das 39 amostras que tinham sido detectadas positivas para *Babesia* por meio de esfregaços sanguíneos foram analisados com este par de oligonucleotídeos. Um produto de aproximadamente 1.402pb foi amplificado em todas estas 39 amostras (Figura 4). Este par de oligonucleotídeos não pôde ser utilizado para o delineamento da PCR multiplex porque apresentou mais de uma banda, o que poderia confundir os resultados.

A sequência obtida pelo sequenciamento com o oligonucleotídeo RBC-f de uma das bandas amplificadas da amostra 32B correspondeu a 336 nucleotídeos (Figura 5). A consulta no BLAST apresentou 99% de identidade com a sequência parcial do gene 18S rRNA de

Vulpes vulpes (AY471616.1) e de *Canis familiaris* (DQ287955.1). Demonstrando que este par de oligonucleotídeos também se anela a uma região do DNA de canídeos.

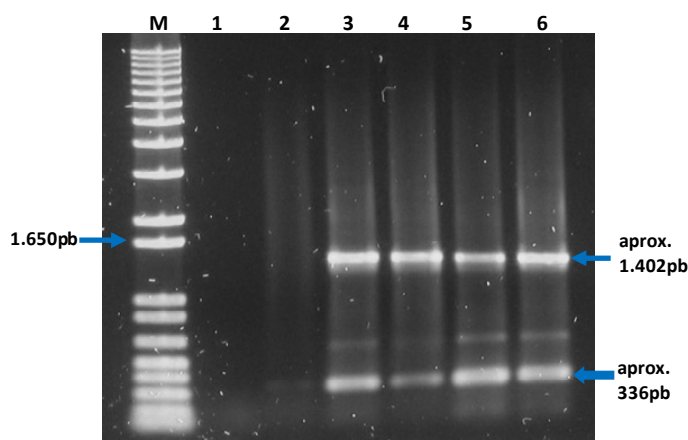


Figura 4 Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Resultados obtidos da amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores RBC-f/RBC-r, de uma porção do gene 18S rRNA de *Babesia* ($\approx 1.402\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa (40N), [3-6]: amostras positivas para *Babesia* (17B, 20B, 37B e 26B).

1	CGTCATGTAA	ATCATGTTAT	GGTTCCTTTG	GTCGCTCGCT	CCTCTCCTAC	TTGGATAACT
61	GTGGTAATTC	TAGAGCTAAT	ACATGCCGAC	GGGCGCTGAC	CCCCCTCGCG	GGGGGGATGC
121	GTGCATTTAT	CAGATCAAAA	CCAACCCGGT	CAGCCTCCCT	CCGGCCCCGG	CCGGGGGGCG
181	GGCGCCGGCG	GCTTTGGTGA	CTCTAGATAA	CCTCGGGCCG	ATCGCACGCC	CCCCGTGGCG
241	GCGACGACCC	ATTGGAACGT	CTGCCCTATC	AACTTTTCGAT	GGTAGTCGCC	GTGCCTACCA
301	TGGTGACCAC	GGGTGACGGG	GATTGATTTT	TGTAAA		

Figura 5. Sequência obtida após o sequenciamento com o oligonucleotídeo RBC-f de uma banda inespecífica amplificada, da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores RBC-f/RBC-r, da amostra 32B.

3.3 Triagem das Amostras

Na Tabela 5 estão descritos os resultados dos esfregaços sanguíneos de todas as amostras, indicando o tipo celular onde foram encontradas as inclusões sugestivas de infecção por agentes da família Anaplasmataceae, e os resultados obtidos da triagem confirmatória por PCR com os oligonucleotídeos A17/EC3 e PIRO-A1/PIRO-B.

Tabela 5. Resultado do diagnóstico por meio de esfregaços sanguíneos e resultados obtidos da confirmação por PCR com os oligonucleotídeos A17/EC3 e PIRO-A1/PIRO-B, realizada em 109 amostras de sangue de cães.

AMOSTRAS	DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO		CONFIRMAÇÃO POR PCR	
	Inclusão Intracelular ^a	Presença de <i>Babesia</i>	<i>Ehrlichia</i> (A17/EC3)	<i>Babesia</i> (PIRO-A1/PIRO-B)
1E	Mon.	ND	+	ND
2E	Mon.	ND	+	ND
3E	Mon.	ND	ND	ND
4E	Mon.	ND	ND	+
5E	Mon.	ND	ND	ND
6E	Mon.	ND	ND	ND
7E	Mon.	ND	ND	ND
8E	Mon.	ND	ND	+
9E	Mon.	ND	ND	ND
10E	Mon.	ND	ND	ND
11E	Mon.	ND	+	ND
12E	Mon.	ND	+	ND
13E	Mon./Plaq.	ND	ND	ND
14E	Mon.	ND	ND	+
15E	Mon.	ND	ND	ND
16E	Mon.	ND	ND	ND
17E	Mon./Plaq.	ND	ND	ND
18E	Mon.	ND	ND	+
19E	Mon.	ND	+	ND
20E	Mon.	ND	+	ND
22E	Mon.	ND	ND	ND
23E	Mon.	ND	ND	+
24E	Mon.	ND	+	ND
25E	Mon.	ND	+	ND
28E	Linf.	ND	ND	ND
32E	Mon.	ND	+	ND
33E	Mon.	ND	+	ND
35E	Mon.	ND	+	ND
36E	Mon.	ND	+	ND
40E	Mon.	ND	ND	ND
1B	ND	+	ND	+
2B	ND	+	ND	+
3B	ND	+	ND	+
4B	ND	+	ND	+
5B	ND	+	ND	+
6B	ND	+	ND	+
7B	ND	+	ND	+
8B	ND	+	ND	+
9B	ND	+	ND	+
Tabela 5. Continuação.				
10B	ND	+	ND	+
11B	ND	+	+	+

12B	ND	+	ND	+
13B	ND	+	ND	+
14B	ND	+	ND	+
15B	ND	+	ND	+
16B	ND	+	ND	+
17B	ND	+	ND	+
18B	ND	+	ND	+
19B	ND	+	ND	+
20B	ND	+	ND	+
21B	ND	+	ND	+
22B	ND	+	ND	+
23B	ND	+	ND	+
24B	ND	+	ND	+
25B	ND	+	ND	+
26B	ND	+	ND	+
27B	ND	+	ND	+
28B	ND	+	ND	+
29B	ND	+	ND	+
30B	ND	+	ND	+
31B	ND	+	ND	+
32B	ND	+	ND	+
33B	ND	+	ND	+
34B	ND	+	ND	+
35B	ND	+	ND	+
36B	ND	+	+	ND
37B	ND	+	ND	+
M1	Plaq./Hepatozoon em neutrófilo	+	ND	+
M2	Mon.	+	+	+
1N	ND	ND	ND	ND
2N	ND	ND	ND	ND
3N	ND	ND	ND	ND
4N	ND	ND	ND	ND
5N	ND	ND	ND	ND
6N	ND	ND	ND	ND
7N	ND	ND	ND	ND
8N	ND	ND	ND	ND
9N	ND	ND	ND	ND
10N	ND	ND	ND	ND
11N	ND	ND	ND	ND
12N	ND	ND	ND	ND
13N	ND	ND	ND	+
14N	ND	ND	ND	+
15N	ND	ND	ND	ND
16N	ND	ND	ND	ND
Tabela 5. Continuação.				
17N	ND	ND	ND	ND
18N	ND	ND	ND	ND

19N	ND	ND	ND	ND
20N	ND	ND	ND	ND
21N	ND	ND	ND	ND
22N	ND	ND	ND	ND
23N	ND	ND	ND	ND
24N	ND	ND	ND	ND
25N	ND	ND	ND	ND
26N	ND	ND	ND	ND
27N	ND	ND	ND	ND
28N	ND	ND	ND	ND
29N	ND	ND	ND	ND
30N	ND	ND	ND	ND
31N	ND	ND	ND	ND
32N	ND	ND	ND	ND
33N	ND	ND	ND	ND
34N	ND	ND	ND	ND
35N	ND	ND	ND	ND
36N	ND	ND	ND	ND
37N	ND	ND	ND	ND
38N	ND	ND	ND	ND
39N	ND	ND	ND	ND
40N	ND	ND	ND	ND

^aTipo celular onde foram encontradas as inclusões intracelulares sugestivas de infecção por agentes da família Anaplasmataceae: Mon. - monócito, Pla. - plaqueta, Linf. - linfócito; (ND) não detectado; (+) positivo.

3.3.1 Amplificação com os Oligonucleotídeos A17/EC3 – *Ehrlichia*

Um produto de aproximadamente 600pb foi amplificado em 15 (13,8%) das 109 amostras analisadas (Figuras 6 e 7). Destas, duas amostras eram do grupo com diagnóstico positivo apenas para *Babesia* por meio de esfregaços sanguíneos (11B e 36B).

Embora este resultado tenha sido abaixo do esperado, isto não significa que não haja infecção por agentes da família Anaplasmatacea nas amostras que deram resultado negativo na PCR, principalmente nas amostras que se apresentaram positivas nos esfregaços sanguíneos.

Apesar da alta sensibilidade da PCR, ocorrência de resultados falsos negativos tem sido registrada, e tem sido atribuída principalmente à presença de substâncias inibidoras da polimerase nas amostras analisadas (HAYDEN et al., 1991; BARKER et al., 1994).

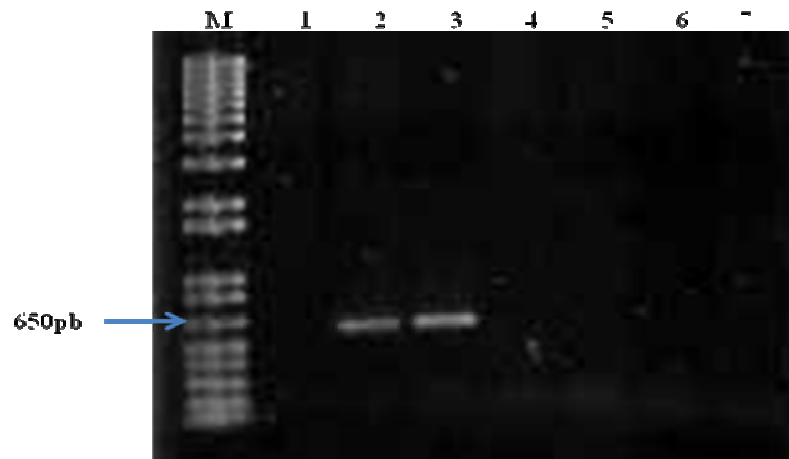


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3, de uma porção do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* (\approx 600pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: controle positivo (amostra *E. canis*-Jaboticabal) e [3]: amostra positiva para *Ehrlichia* (25E), [4-7]: amostras negativas para *Ehrlichia* (37E, 38E, 39E e 40E).

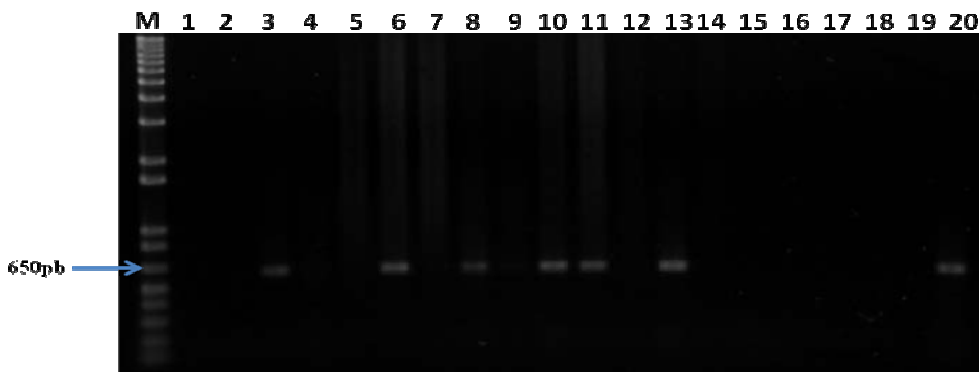


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3, de uma porção do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* (\approx 600pb). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa (37N), [3]: controle positivo (amostra *E. canis*-Jaboticabal), [6, 8, 10, 11, 13 e 20]: amostras positivas para *Ehrlichia* (12E, 19E, 24E, 25E, 32E e M2), [4, 5, 7, 9, 12, 14-19]: amostras negativas para *Ehrlichia* (9E, 10E, 13E, 23E, 26E, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B).

Iqbal et al. (1994) analisaram a sensibilidade deste par de oligonucleotídeos e obtiveram amplificação com a partir de, apenas, 20pg de DNA de *E. canis* extraído de células DH82 infectadas. Mas, a PCR não detectou a infecção por *E. canis* em cinco cães nos dias 0 e 2 pós inoculação (PI) intravenosa com células DH82 infectadas com *E. canis* suspensas em 5mL de meio essencial mínimo. O produto de 600pb da PCR foi detectado apenas a partir do

4º dia PI para o cão de número 303, do 6º dia PI para os cães de números 320 e 340, do 8º dia PI para o cão 011 e do 10º dia PI para o cão 307. Isto poderia explicar a não amplificação pela PCR de algumas amostras no presente estudo, já que apesar de ser altamente sensível e específica, a detecção de parte de um genoma de um determinado microrganismo, pela técnica da PCR, pode não ser conseguida devido a uma quantidade reduzida do DNA-alvo.

Ou do contrário, outro fato a ser considerado, seria a ocorrência de resultados falso-positivos em algumas amostras que foram diagnosticadas pelo método do esfregaço sanguíneo. Pois, observa-se uma grande diversidade na morfologia, tamanho, coloração e localização das inclusões citoplasmáticas, as quais podem apresentar semelhança com inclusões decorrentes de infecções bacterianas severas (corpúsculos de Döhle), inflamações, neoplasias, doenças autoimunes, infecção viral (corpúsculos de Lentz), destruição tissular severa (JAIN, 1993; COWEL et al., 1999; SCHALM, 2000), estruturas fagocitadas e/ou sobrepostas de outros hemoparasitos, precipitados de corantes e artefatos sobre os leucócitos (NEITZ; THOMAS, 1938).

3.3.2 Amplificação com os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B – *Babesia*

Um produto de aproximadamente 450pb foi amplificado em 46 (42,2%) das 109 amostras analisadas (Figuras 8 e 9). Destas, duas amostras eram do grupo com diagnóstico negativo (13N e 14N) e cinco do grupo com diagnóstico positivo para *Ehrlichia* por meio de esfregaços sanguíneos (4E, 8E, 14E, 18E e 23E). Além disso, uma das amostras que tinha sido detectada positiva para *Babesia* (36B) não amplificou com este par de oligonucleotídeos, mas, obteve resultado positivo para *Ehrlichia* com os oligos A17/EC3 (Tabela 5).

Este resultado demonstra a limitação do diagnóstico microscópico (baixa sensibilidade) e confirma o relato de Vercammen et al. (1995), de que o diagnóstico de *B. canis* realizado pela observação direta do agente no esfregaço sanguíneo é altamente específico, porém, apresenta baixa sensibilidade devido à parasitemia variável, o que pode dificultar a visualização de eritrócitos circulantes parasitados.

A PCR da amostra coinfectada M1, que também apresentou gametócitos de *Hepatozoon* ao exame do esfregaço sanguíneo, amplificou um produto de aproximadamente 500pb e o resultado obtido do sequenciamento revelou ser *Hepatozoon canis* (item 3.7.2). Este mesmo resultado foi obtido por O'Dwyer et al. (2009) que ao analisar amostras sanguíneas de 150 cães de zonas rurais de São Paulo, por esfregaços sanguíneos e PCR, utilizando este mesmo par de oligonucleotídeos, alguns destas apresentaram uma banda maior do que a banda correspondente à *Babesia* (cerca de 500pb) e, o sequenciamento destas amostras revelou serem *H. canis*. A reação cruzada entre *Babesia* e *Hepatozoon* em PCR também foi observada por Oyamada et al. (2005) ao utilizar os oligonucleotídeos *Babesia* F e *Babesia* R. Segundo estes autores, dos 78 cães analisados, 33 estavam positivos para *Hepatozoon* e, dentre estes, três cães apresentaram duas bandas (uma de *Babesia* e outra de *Hepatozoon*).

Comparando o diagnóstico microscópico com a PCR, o presente estudo mostrou que o diagnóstico molecular realizado pelas reações de PCR para *Babesia* foi equivalente ou superior ao diagnóstico realizado pela microscopia óptica, já que os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B, com exceção da amostra 36B, amplificaram todas as amostras detectadas positivas para *Babesia* por meio do esfregaço sanguíneo, além de detectar outras amostras positivas.

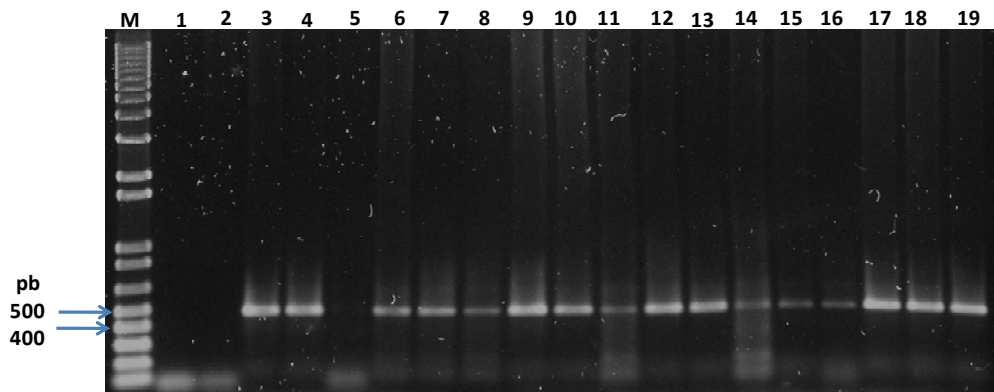


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B, de uma porção do gene 18S rRNA de *Babesia* ($\approx 450\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: controle positivo (amostra *B. canis*-Jaboticabal) e [4, 6-19]: amostras positivas para *Babesia* (1B, 2B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 16B, 17B e 18B), [5]: amostra negativa para *Babesia* (1E).

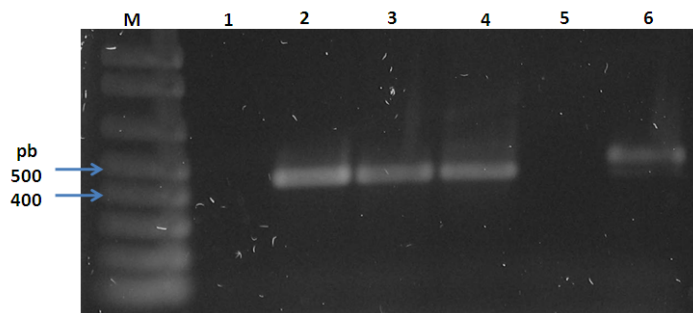


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Amplificação por PCR, realizada com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B, de uma porção do gene 18S rRNA de *Babesia* ($\approx 450\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2-4]: amostras positivas para *Babesia* (3B, 29B e 32B), [5]: amostra negativa para *Babesia* (36B), [6]: amostra positiva para *Hepatozoon* (M1) ($\approx 500\text{pb}$).

3.4 Sensibilidade Analítica das PCRs

O limiar de detecção dos oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B (Figura 10) foi de até 10^{-3} ($\approx 0,1\text{ng}$), e, o dos oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3 (Figura 11) foi de até 10^{-1} ($\approx 12\text{ng}$), demonstrando a limitada detecção deste último.

As concentrações dos DNAs totais dos controles estão apresentadas no Anexo B.

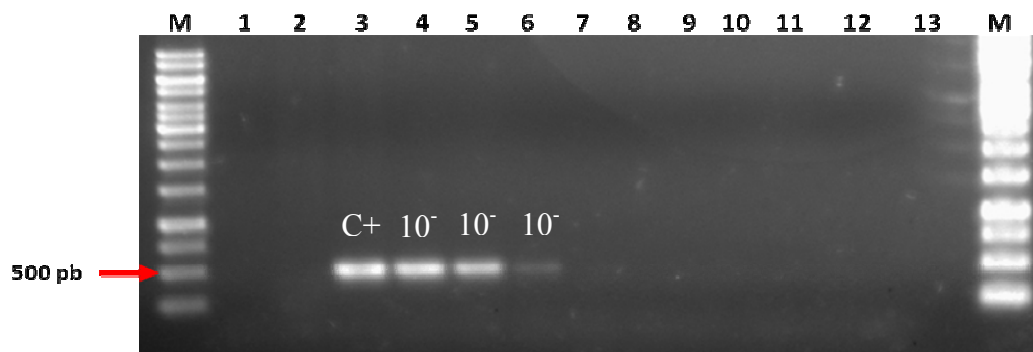


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Sensibilidade analítica da PCR com os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B (≈ 450 pb). [M]: padrão de massa molecular Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: DNA controle positivo sem diluição (amostra *B. canis-Jaboticabal*) e [4-12]: diluição 10^{-1} a 10^{-9} , [13]: canaleta vazia.

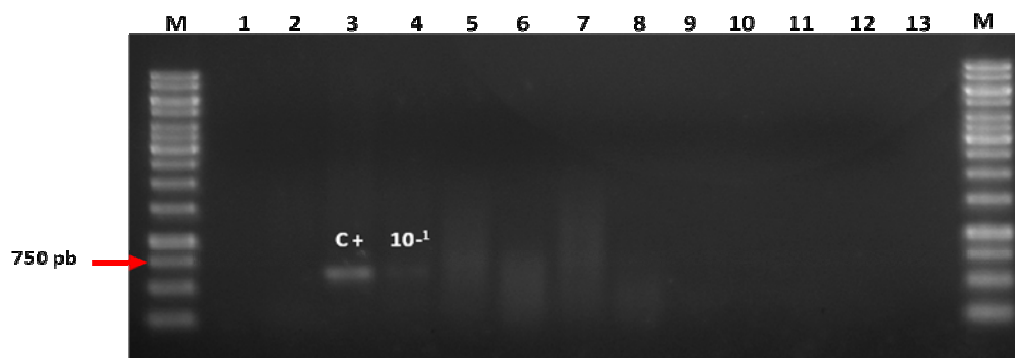


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Sensibilidade analítica da PCR com os oligonucleotídeos A17/EC3 (≈ 600 pb). [M]: padrão de massa molecular Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: DNA controle positivo sem diluição (amostra *E. canis-Jaboticabal*) e [4-12]: diluição 10^{-1} a 10^{-9} , [13]: canaleta vazia.

3.5 PCR Multiplex para Detecção Simultânea de *Ehrlichia* e *Babesia*

O presente estudo objetivou desenvolver um ensaio de PCR multiplex para o diagnóstico de *Ehrlichia* e *Babesia* a partir do DNA do sangue de cães infectados, visando auxiliar no diagnóstico clínico e laboratorial. A PCR multiplex consiste em um ensaio rápido e de menor custo, que utiliza um ou vários pares de oligonucleotídeos em uma única reação. Para isto, os oligonucleotídeos utilizados devem amplificar fragmentos de diferentes tamanhos para cada espécie que se deseja detectar. Portanto, para a amplificação de *Ehrlichia* utilizou-se o par de oligonucleotídeos A17/EC3 que amplifica um produto de aproximadamente 600pb e para a amplificação de *Babesia* utilizou-se o par de oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B que amplifica um produto de aproximadamente 450pb.

Nas primeiras reações testou-se a utilização dos dois oligonucleotídeos na mesma concentração utilizada nas PCRs simples. Em todas as reações realizadas, a amplificação de

Babesia era favorecida em detrimento da amplificação de *Ehrlichia*. A banda referente ao produto de *Ehrlichia* só foi obtida a partir da utilização de 8µL do DNA controle positivo (*E. canis* – Jaboticabal), sem acrescentar o DNA de *Babesia* na reação. Além disso, quando o oligonucleotídeo PIRO-B (antisense) não foi adicionado em uma reação contendo 4µL do DNA controle positivo de *B. canis* + 8µL do DNA controle positivo de *E. canis*, apenas o produto de *Ehrlichia* foi amplificado.

Apenas a amostra coinfetada M2 apresentou a amplificação de dois produtos pela reação de PCR multiplex (canaletas 3 das Figuras 12 e 13). E, isto foi conseguido quando a concentração dos oligonucleotídeos A17/EC3 foi duplicada na reação (2µM). Foi realizado um teste utilizando 1,5µM deste par de oligos e a amplificação das duas bandas também foi obtida (canaleta 2 da Figura 13), mas a banda de *Ehrlichia* apresentou uma banda mais fraca, indicando ter ocorrido uma menor quantidade de material amplificado.

Em todas as reações realizadas utilizando o DNA das outras amostras coinfetadas (11B e M1) ou misturas de DNA positivo para *Ehrlichia* com DNA positivo para *Babesia* em diferentes proporções (µL), inclusive utilizando misturas dos controles positivos (*B. canis* e *E. canis* - Jaboticabal), apenas ocorreu amplificação do produto de *Babesia* (≈450pb) ou de *Hepatozoon* (≈500pb) no caso da amostra M1 (Figuras 12 e 13). Isto, provavelmente, deve ter ocorrido devido a uma maior abundância do DNA de *Babesia* nas amostras, oferecendo maior quantidade de região-alvo para o anelamento dos oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B e consequente consumo dos reagentes na reação.

Figuroa et al. (1993) observaram que o resultado da PCR multiplex realizada com pools de amostras de sangue coletadas de bovinos experimentalmente infectados com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* também não pôde ser observado em géis corados com brometo de etídio. Entretanto, no Southern blotting e hibridização de ácidos nucléicos com sondas não radioativas específicas para estas espécies apresentaram sinais positivos de hibridização com a sonda de *B. bovis* nas quatro amostras. Três das quatro amostras misturadas mostrou sinal de hibridização quando a sonda específica para *B. bigemina* foi utilizada e apenas duas das misturas de sangue de bovino deram positivas com a sonda específica para *A. marginale*.

Além do DNA controle positivo para *E. canis*- Jaboticabal, das 15 amostras que obtiveram amplificação para *Ehrlichia* na PCR simples realizada com o par de oligonucleotídeos A17/EC3, apenas 8 apresentaram produtos detectáveis pela PCR multiplex (Figuras 13 e 14).

Das 40 amostras de DNA negativas no esfregaço sanguíneo, 38 (1N a 12N e 15N a 40N) tiveram resultado negativo na PCR multiplex. Apenas as duas amostras (13N e 14N) que tinham dado resultado positivo para *Babesia* na PCR simples com os oligos PIRO-A1 e PIRO-B foram positivas também na PCR multiplex.

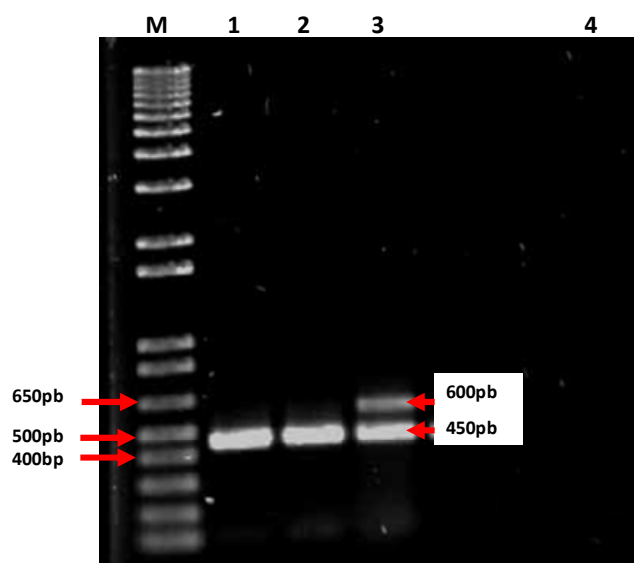


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos da PCR multiplex, de porções do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* ($\approx 600\text{pb}$) e 18S rRNA de *Babesia* ($\approx 450\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: mistura dos controles positivos – Jaboticabal (8 μL da amostra *E. canis* e 4 μL da amostra *B. canis*), [2]: mistura dos controles positivos – Jaboticabal (8 μL da amostra *E. canis* e 4 μL da amostra *B. canis*), [3]: amostra positiva de um cão naturalmente coinfectado com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2), [4]: controle negativo da reação.

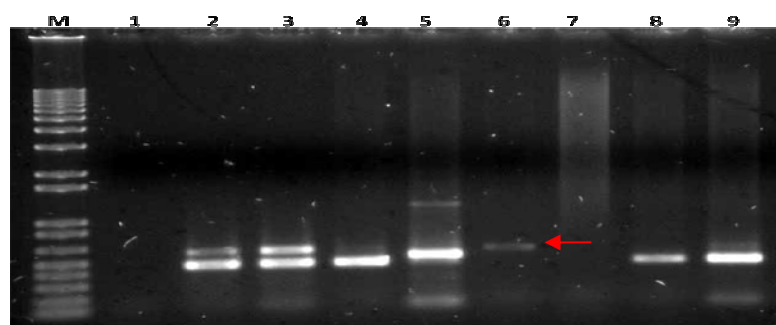


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos da PCR multiplex, de porções do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* ($\approx 600\text{pb}$) e 18S rRNA de *Babesia* ($\approx 450\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra positiva de um cão naturalmente coinfectado com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2), [3-5]: amostras positivas de cães naturalmente coinfectados com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2, 11B e M1), [6]: amostra positiva para *Ehrlichia* (36B), [7]: mistura de 6 μL de amostra positiva para *Babesia* (33B) com 6 μL de amostra positiva para *Ehrlichia* (36E), [8]: mistura de 6 μL de amostra positiva para *Babesia* (26B) com 6 μL de amostra positiva para *Ehrlichia* (2E), [9]: mistura de 6 μL de amostra positiva para *Babesia* (33B) com 6 μL da amostra controle positivo para *E. canis*-Jaboticabal.

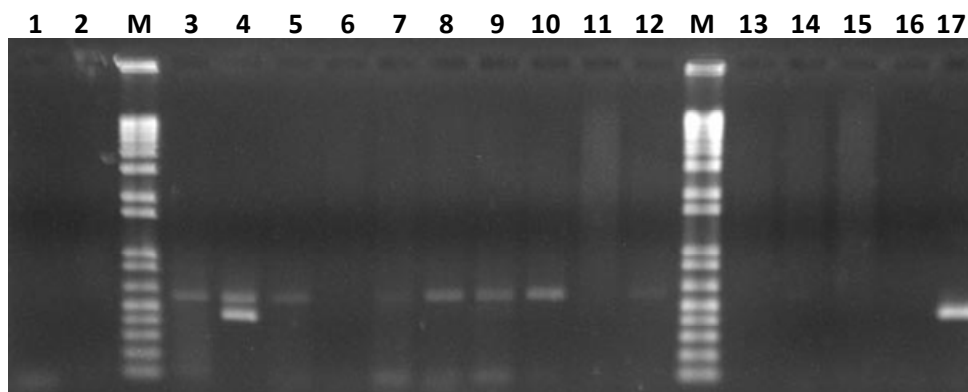


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos da PCR multiplex, de porções do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* ($\approx 600\text{pb}$) e 18S rRNA de *Babesia* ($\approx 450\text{pb}$). [M]: padrões de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra negativa, [3]: controle positivo para *Ehrlichia* (amostra *E. canis*-Jaboticabal), [4]: amostra positiva de um cão naturalmente coinfectado com *Ehrlichia* e *Babesia* (M2), [5, 7-10 e 12]: amostras positivas para *Ehrlichia* (1E, 11E, 12E, 19E, 20E e 25E), [6, 11 e 13-16]: amostras positivas para *Ehrlichia* que não amplificaram na PCR multiplex (2E, 24E, 32E, 33E, 35E e 36E), [17]: controle positivo para *Babesia* (amostra *B. canis*-Jaboticabal).

3.6 Sequenciamento de Amplicons Obtidos da PCR Realizada com os Oligonucleotídeos Iniciadores A17/EC3, RBC-f/RBC-r e PIRO-A1/PIRO-B

Para confirmar os resultados das PCRs e verificar a relação da identidade dos isolados com as espécies dos respectivos gêneros, alguns produtos de DNA amplificado (amplicons) foram purificados e sequenciados para a realização de análises filogenéticas.

3.6.1 Purificação das reações de PCR

As amostras purificadas apresentaram um bom grau de pureza para o sequenciamento (Figuras 15, 16 e 17).

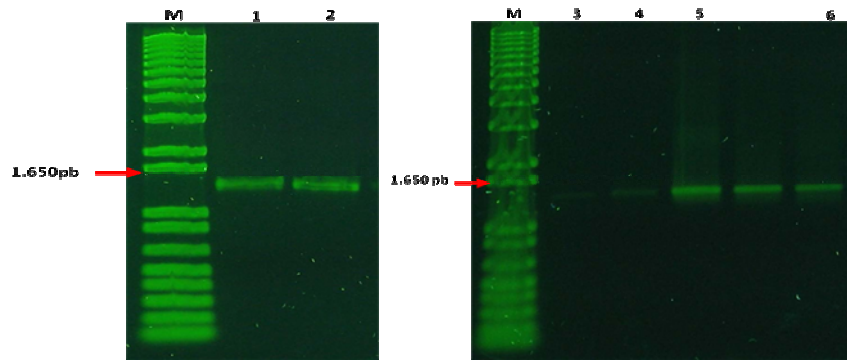


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Resultado obtido das purificações dos produtos das PCRs realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores RBC-f/RBC-r ($\approx 1.402\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: amostra 1B, [2]: amostra 2B, [3]: amostra 3B, [4]: amostra 4B, [5]: amostra 10B e [6]: amostra 16B.

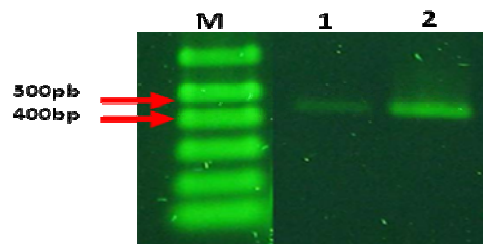


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com solução de Sybr Gold. Resultado obtido das purificações dos produtos das PCRs realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B ($\approx 450\text{pb}$). [M]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]), [1]: amostra 9B e [2]: amostra 12B.

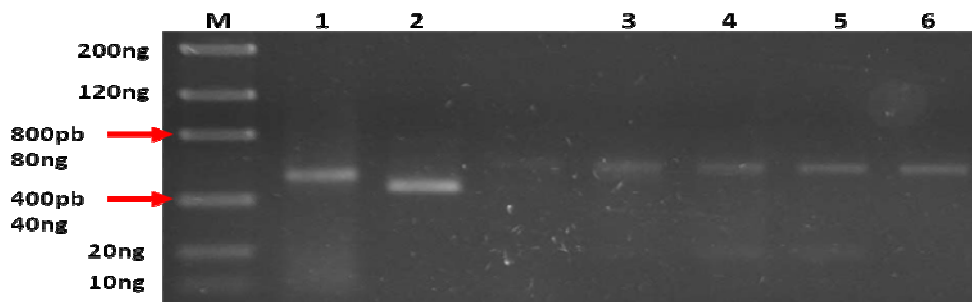


Figura 17. Quantificação dos produtos de PCR após purificação. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com solução de Sybr Gold. [M]: padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder de 100 a 2.000pb (Invitrogen[®]), [1-2]: Purificações dos produtos de PCR, realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores PIRO-A1/PIRO-B – amostra M1 ($\approx 500\text{pb}$) e amostra M2 ($\approx 450\text{pb}$), [3-6]: Purificações dos produtos de PCR, realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores A17/EC3 ($\approx 600\text{pb}$) - amostras 11E, 19E, 20E e M2.

3.6.2 Análise de similaridade das sequências obtidas do sequenciamento, utilizando a ferramenta BLAST

A qualidade do sequenciamento dos produtos de PCR purificados, obtidos com os oligonucleotídeos PIRO-A1/PIRO-B foi adequada em ambas as fitas do DNA, diferente dos obtidos com os oligonucleotídeos A17/EC3 sendo, a maioria, adequada apenas no sentido “forward”.

A sequência consenso da amostra 19E (241pb) (oligonucleotídeos A17 e EC3), formada a partir de quatro sequências alinhadas, apresentou identidade de 88% ($e = 1e-71$) para o gene 16S rRNA com a cepa Germishuys de *Ehrlichia* sp. (U54805) isolada do linfonodo de uma ovelha na África do Sul.

Os sequenciamentos das amostras 20E (consenso de 149pb) e M2 (consenso de 574pb) com os oligonucleotídeos A17 e EC3 resultaram em sequências senso de boa qualidade, porém, as sequências antisenso obtidas foram muito curtas e não foi possível a formação de uma sequência contígua com ambas as fitas da sequência. Estas amostras apresentaram identidades de 95% ($e = 2e-57$) e 93% ($e = 0,0$), respectivamente, com a cepa de *E. canis* (AY394465) isolada do sangue de um cão na Espanha.

O sequenciamento da amostra 11E produziu apenas uma sequência senso e outra antisenso muito curtas, não sendo possível sua utilização nas análises filogenéticas.

As sequências senso obtidas das amostras 1B, 2B, 3B, 4B, 10B e 16B, sequenciadas com o oligonucleotídeo RBC-f, apresentaram 792pb, 815pb, 433pb, 635pb, 829pb e 832pb, respectivamente. As sequências antisenso obtidas das amostras 9B e 12B, sequenciadas com o oligonucleotídeo PIRO-B, apresentaram 278pb e 422pb, respectivamente. Na consulta de similaridade de nucleotídeos por meio da ferramenta BLAST, todas estas sequências apresentaram altos graus de identidade (variando de 94 a 99%) com a sequência de *B. canis vogeli* (DQ297390) da Venezuela, sendo que, as amostras 1B e 4B apresentaram as maiores porcentagens (99%).

A sequência consenso da amostra M2 (424pb) (oligonucleotídeos PIRO-A1 e PIRO-B), formada a partir de quatro sequências alinhadas, apresentou identidade de 98% ($e = 0,0$) com o mesmo isolado da Venezuela (DQ297390) que as outras amostras de *B. canis vogeli* sequenciadas com o oligonucleotídeo RBC-f e, apresentou também, o mesmo grau de identidade (98%; $e = 0,0$) com a cepa de *B. canis vogeli* (EF636702) isolada de um gato no Brasil.

A sequência consenso da amostra M1 (453pb) (oligonucleotídeos PIRO-A1 e PIRO-B), formada a partir de 11 sequências alinhadas, apresentou identidade de 97% ($e = 0,0$) para o gene 18S rRNA do isolado de *Hepatozoon canis* da Espanha (AY1500672). Este resultado confirma o que foi relatado por O'Dwyer et al. (2009), de que os oligonucleotídeos PIRO-A1 e PIRO-B, os quais foram descritos como específicos para *Babesia* spp., podem também detectar *H. canis*.

Hepatozoon canis causa a hepatozoonose, uma doença de caráter crônico debilitante, e também está associado com a coinfeção com outras doenças. Alguns autores consideram as infecções por *H. canis* assintomáticas (MCCULLY et al., 1976), e que o encontro de gametócitos, na circulação, é ocasional, atribuindo, a outros agentes infecciosos, eventuais sintomas clínicos observados em cães portadores (OGUNKOYA et al., 1981; GOSSETT et al., 1985; MURATA et al., 1991; HARMELIN et al., 1992). Este agente já foi diagnosticado associado a *Toxoplasma gondii* (HARMELIN et al., 1992; MUNDIM et al., 1994), *E. canis* (MUNDIM et al., 1994, O'DWYER et al., 1997; GONDIM et al., 1998), *B. canis* (O'DWYER et al., 1997; GONDIM et al., 1998), *Haemobartonella canis* (O'DWYER et al., 1997) e parvovírus (BANETH et al., 1997). A associação, entre estes parasitos, leva a um quadro clínico mais grave do que quando ocorre parasitismo isolado (BANETH et al., 1997).

3.6.3 Construção das árvores filogenéticas

A matriz de distância e o método de construção da árvore filogenética foram calculados pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1.000, pelo programa MEGA-4.

Quando formada a filogenia apenas com a sequência derivada da amostra M2 amplificada com os oligos A17/EC3, das sequências com maiores porcentagens de identidade encontradas pelo BLAST e sequências de outras espécies de *Ehrlichia*, a árvore filogenética formada demonstra que após a separação do grupo externo, as espécies de *E. canis* e *Ehrlichia* sp. se agruparam formando um grupo monofilético (“bootstrap” = 85). Esta análise filogenética também sugeriu que *E. canis* está mais próxima de *E. ruminantium* do que de *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. muris* (Figura 18).

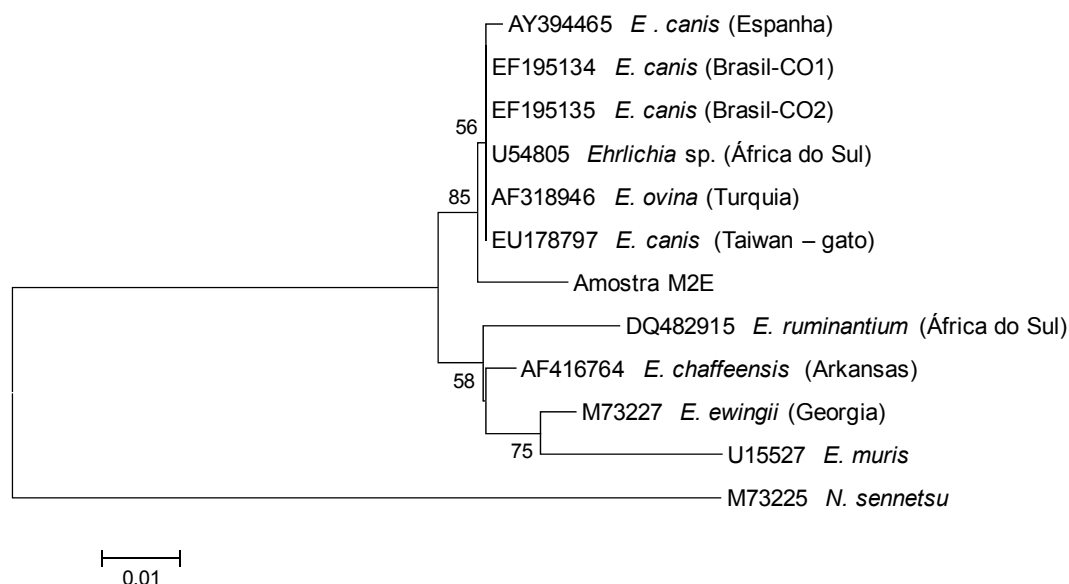


Figura 18. Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia*, utilizando *N. sennetsu* como grupo externo. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com bootstrap de 1.000 repetições. O percentual de árvores replicadas em que os táxons associados se agruparam em conjunto no teste de “bootstrap” está apresentado junto aos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura 2-parâmetros e estão nas unidades de número de substituições de base por sítio. Houve um total de 492 posições no conjunto de dados final. As análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA-4.

Quando formada a filogenia apenas com as sequências derivadas das amostras amplificadas com os oligos RBC-f e PIRO-A1/PIRO-B (1B, 2B, 4B, 9B, 10B, 12B, 16B, M1 e M2), das sequências com maiores porcentagens de identidade encontradas pelo BLAST e sequências de outras espécies de *Babesia*, a árvore filogenética formada (Figura 19) mostrou que as espécies do gênero *Hepatozoon* e as do gênero *Babesia* se dividiram formando dois grupos claramente distintos. No grupo monofilético das espécies de *Hepatozoon*, a cepa de *H.*

americanum de Oklahoma se agrupou sempre em um ramo independente das espécies de *H. canis* brasileiras, dentre estas a amostra M1B e a sequência brasileira DQ071888 de *H. canis* isolada de um cão por Forlano et al. (2007), e da Espanha (“bootstrap” = 91). Este resultado corrobora com os de Rubini et al. (2005) e de Forlano et al. (2007), confirmando a hipótese de que o agente causal da hepatozoonose nestas áreas estudadas no Brasil é *H. canis*.

As espécies de *Babesia* se agruparam em um grande grupo (“cluster”). A espécie *B. bovis* (L19078) ficou em um ramo separado das outras espécies de *Babesia*; *B. gibsoni* e *B. divergens* formaram um grupo monofilético (“bootstrap” = 58) também separado. A análise filogenética também mostrou que *B. canis canis* e *B. canis rossi* estão mais proximamente relacionadas, indicando que *B. canis vogeli* é separada filogeneticamente destas duas subespécies de *B. canis*. Este resultado também foi obtido por Carret et al. (1999). As amostras sequenciadas no presente estudo se agruparam no grupo monofilético das amostras de *B. canis vogeli* da Argentina e da Venezuela (“bootstrap” = 97).

A árvore construída do alinhamento com todas as sequências presentes nas duas primeiras árvores mostrou uma clara separação entre as espécies de *Ehrlichia* (“bootstrap” = 100) e o ramo com as espécies de *Babesia* e *Hepatozoon*. As espécies de *B. canis vogeli* continuaram se agrupando em um mesmo ramo (Figura 20).

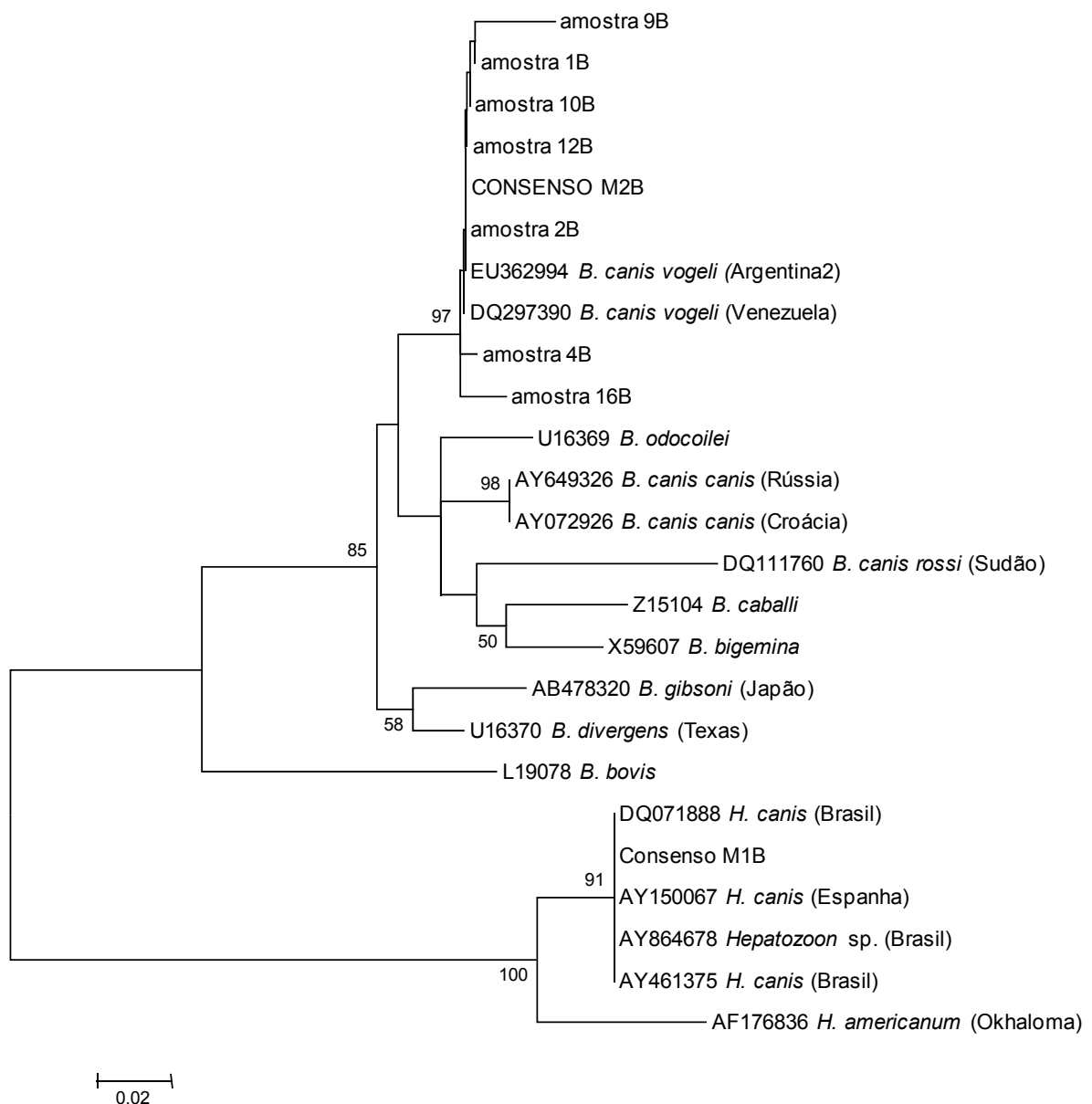


Figura 19. Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia* e *Hepatozoon*. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com bootstrap de 1.000 repetições. O percentual de árvores replicadas em que os táxons associados se agruparam em conjunto no teste de “bootstrap” está apresentado junto aos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura 2-parâmetros e estão nas unidades de número de substituições de base por sítio. Houve um total de 168 posições no conjunto de dados final. As análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA-4.

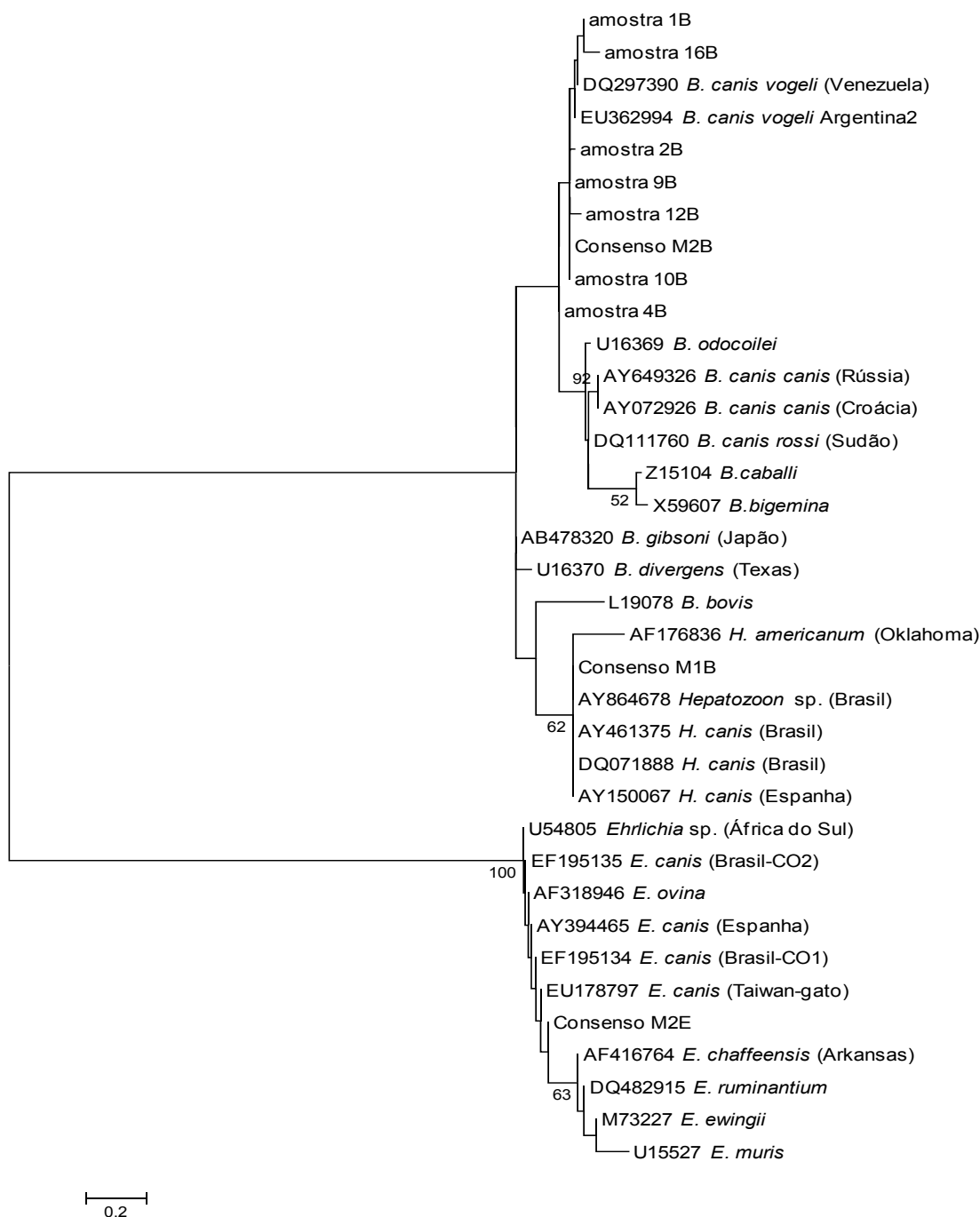


Figura 20. Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 16S rRNA de espécies de *Ehrlichia* do gene 18S rRNA de espécies de *Babesia* e *Hepatozoon*. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1.000 repetições. O percentual de árvores replicadas em que os táxons associados se agruparam em conjunto no teste de “bootstrap” está apresentado junto aos ramos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura 2-parâmetros e estão nas unidades de número de substituições de base por sítio. Houve um total de 162 posições no conjunto de dados final. As análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA-4.

3.7 PCR Multiplex em Tempo Real

A eletroforese em gel de agarose do resultado da análise dos oligonucleotídeos desenhados para a PCR em tempo real, por PCR simples, mostrou que os oligonucleotídeos apresentaram as respectivas bandas com tamanhos esperados (Figura 21).

No final da reação da PCR em tempo real é gerada uma curva de dissociação que permite determinar em qual temperatura o amplicon se dissocia. Então, para cada produto amplificado há uma temperatura diferente, que chamamos de temperatura de “melting” (T_m) ou de dissociação. O valor de T_m do produto amplificado do controle positivo de *Ehrlichia* sp. ($78,4^\circ\text{C}$) diferiu do valor da T_m do produto amplificado do controle positivo de *Babesia* sp. ($75,4^\circ\text{C}$) (Figuras 22 e 23).

A média dos valores de T_m obtidos para cada produto (de *Ehrlichia* e de *Babesia*) amplificado na PCR multiplex em tempo real com os oligonucleotídeos 16S-f/16S-r e com os oligonucleotídeos *Babesia* real-f/*Babesia* real-r foi de $77,59^\circ\text{C} \pm 0,23$ e $74,72^\circ\text{C} \pm 0,24$, respectivamente.

A representação das amplificações dos controles positivos por meio da PCR em tempo real apresentada na Figura 23 mostra que a amplificação de *B. canis* iniciou a partir de aproximadamente 18 ciclos e a amplificação de *E. canis* apenas ocorreu após cerca de 25 ciclos. Esses resultados de CT indicam que a quantidade de DNA de *B. canis* na amostra é maior do que a quantidade de DNA de *E. canis*.

De 94 amostras testadas pela PCR multiplex em tempo real, 37 tiveram amplificação positiva para *Ehrlichia* e 48 para *Babesia* com valores de CT variando de 20,92 a 37,48. A coinfeção foi detectada em sete amostras. Este ensaio foi capaz de detectar tanto infecções únicas quanto a coinfeção (Figura 24), além de misturas de DNA positivo para os dois agentes (Figura 25) com maior eficiência do que a PCR multiplex comum (Tabela 6).

Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo permitiram tanto detectar quanto diferenciar estes dois hemoparasitos. Embora o SYBR Green se ligue a qualquer DNA fita dupla e, por isso, a literatura não recomenda o seu uso em testes de multiplex, a análise da curva de amplificação com suas respectivas T_m s permitiu distinguir não somente os DNAs alvo amplificados (*Ehrlichia* e *Babesia*) como também, os produtos específicos dos inespecíficos.

Mais análises não puderam ser realizadas devido ao tempo curto e ao alto custo dos reagentes.

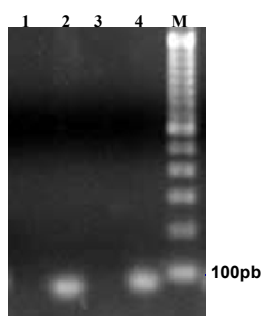


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR em tempo real simples. [M]: padrão de massa molecular Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec[®]), [1]: controle negativo da reação, [2]: amostra controle positivo de *Babesia* ($\approx 71\text{pb}$), [3]: controle negativo da reação, [4]: amostra controle positivo de *Ehrlichia* ($\approx 82\text{pb}$).

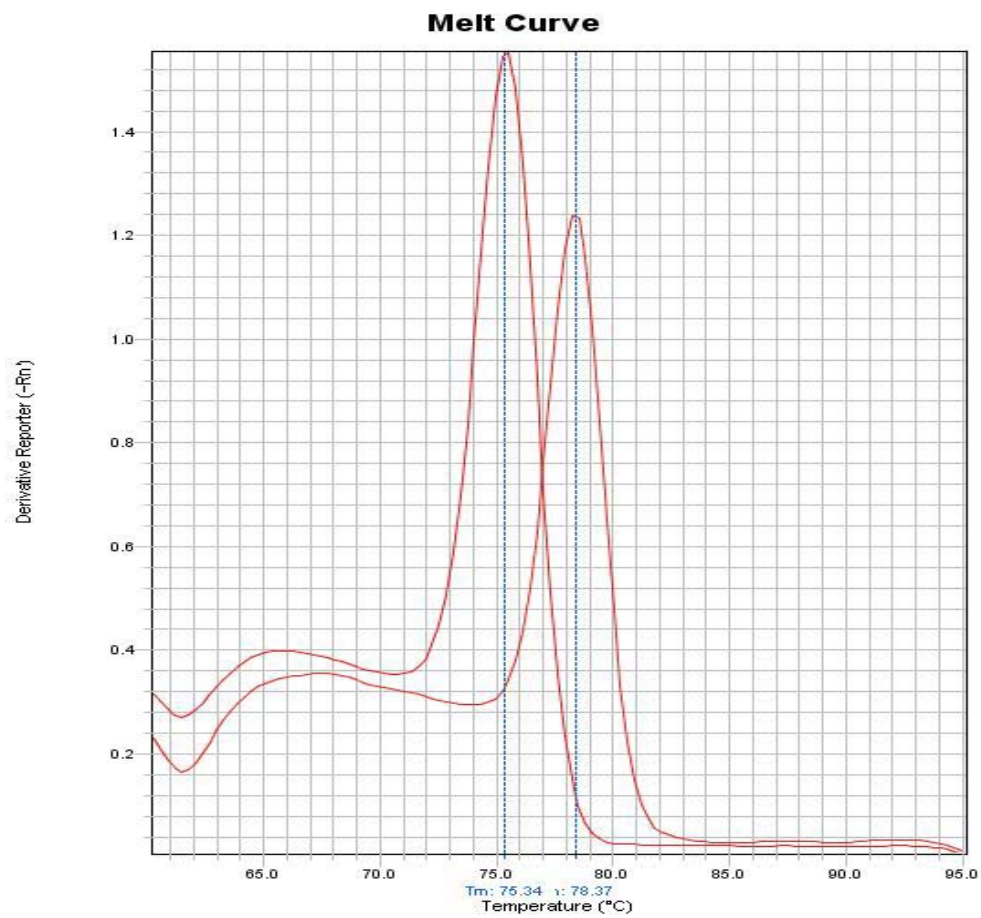
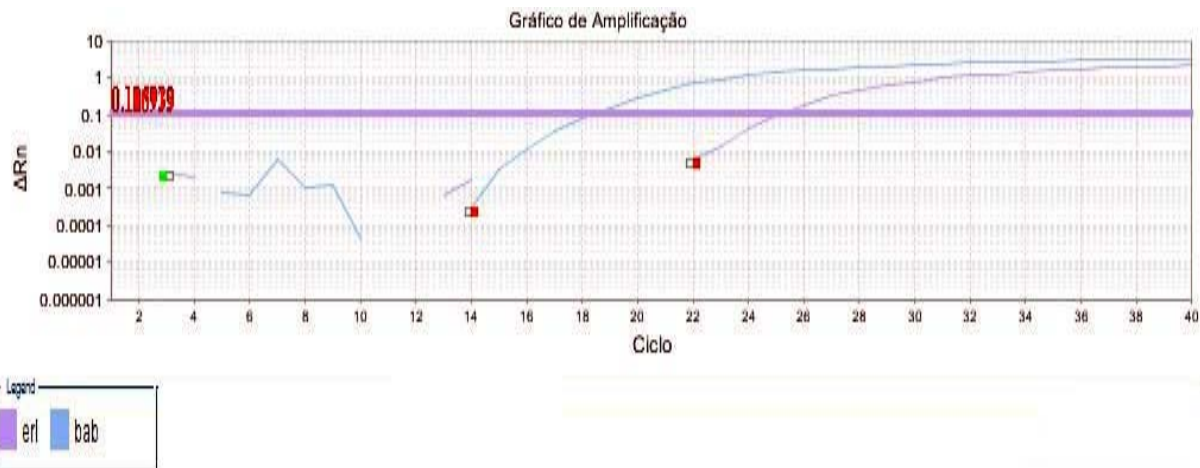


Figura 22. Curva de dissociação (curva de “melt”) dos fragmentos em duas PCRs em tempo real simples, realizadas separadamente. As Tms de valores 75,34°C e 78,37°C representam as amplificações dos controles positivos de *B. canis* e *E. canis* – Jaboticabal, respectivamente.



Legenda:

- (—) Amplificação da amostra controle positivo *B. canis* – Jaboticabal (CT = 18,4);
- (—) Amplificação da amostra controle positivo *E. canis* – Jaboticabal (CT=25,3);
- (—) “Threshold” = 0,106938;
- (ΔRn) magnitude do sinal gerado pela PCR ($Rn - Baseline$).

Figura 23. Representação da curva de amplificação da PCR em tempo real.

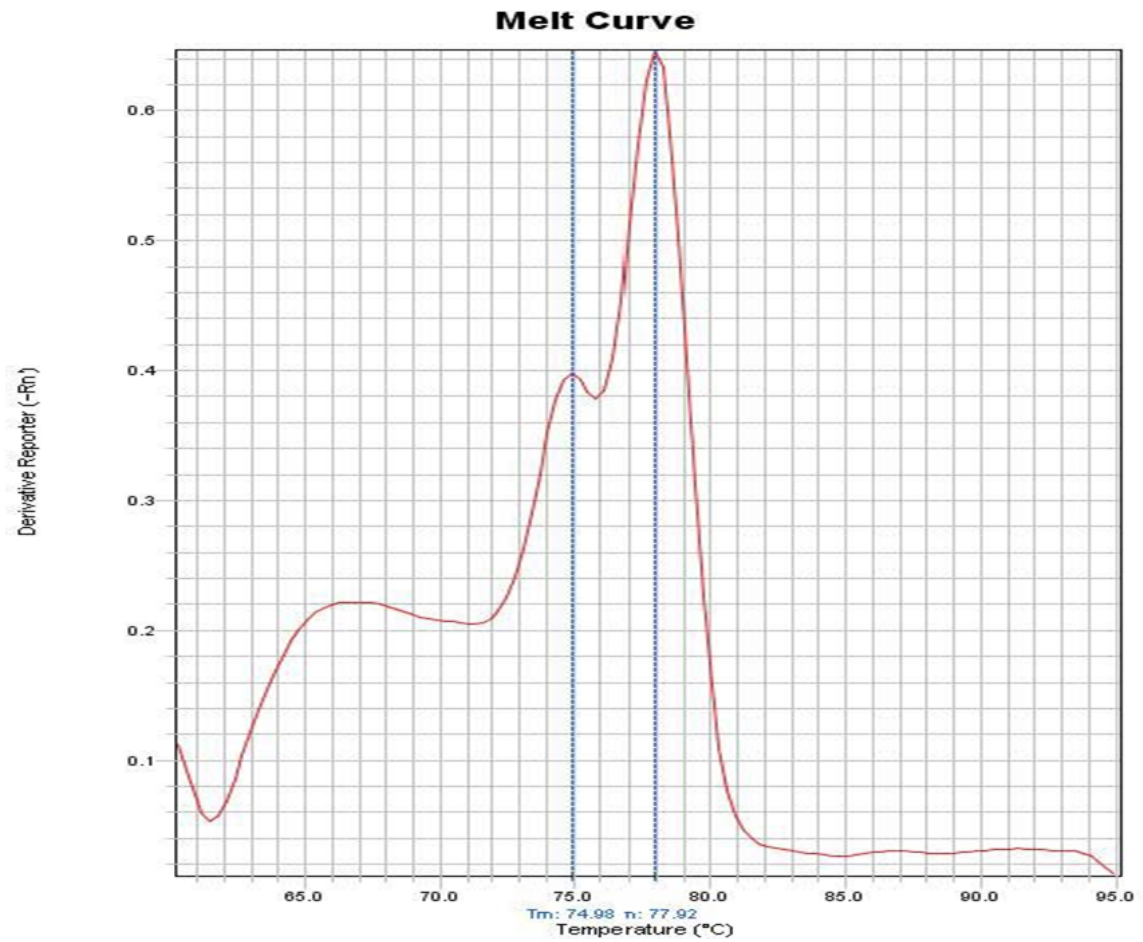


Figura 24. Curva de dissociação (curva de “melt”) dos fragmentos de uma PCR multiplex em tempo real utilizando uma amostra de DNA coinfestado. As Tms de valores 74,08°C e 77,92°C representam as amplificações obtidas da amostra M2.

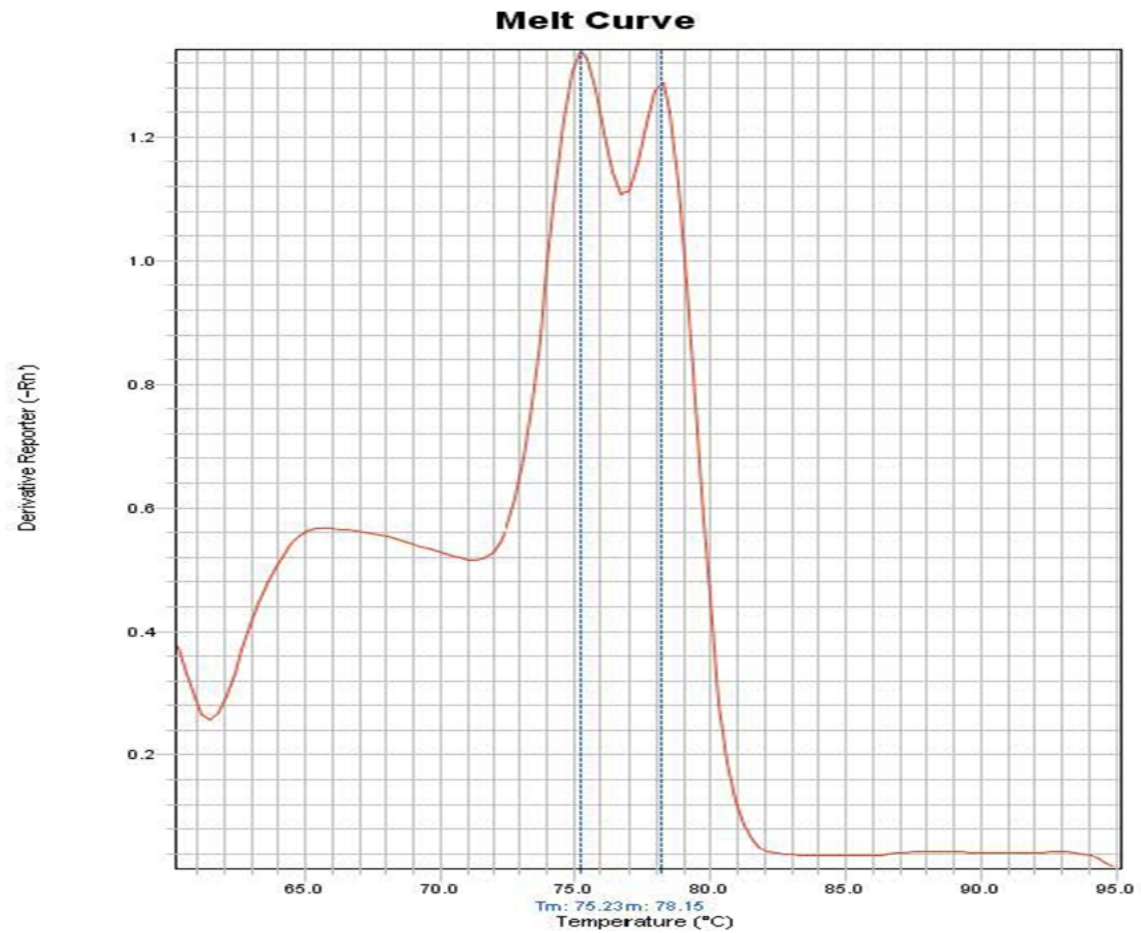


Figura 25. Curva de dissociação (curva de “melt”) dos fragmentos de uma PCR multiplex em tempo real realizada utilizando a mistura de uma amostra de DNA infectado com *Ehrlichia* (24E) com amostra de DNA infectado com *Babesia* (20B). As Tms de valores 75,23°C e 78,15°C representam as ampliações obtidas de *Babesia* e *Ehrlichia*, respectivamente.

Tabela 6. Resultados da PCR multiplex em tempo real.

Valores de Tm e de CT da PCR Multiplex em Tempo Real		
Amostras	Amostras	Amostras

1N	neg	1E	Tm: 77,62 CT:23,32	1B	Tm: 74,78 CT:20,92
2N	Neg	2E	Tm: 77,62 CT:28,81	2B	Tm: 74,93 CT:22,62
3N	Neg	3E	Tm: 77,32 CT:27,94	3B	Tm: 74,48 CT:35,11
4N	Neg	4E	Neg	4B	Tm: 74,63 CT:25,76
5N	Tm: 77,47 CT:37,48	5E	Tm: 74,48 e 77,15 CT:34,03	5B	Tm: 74,48 CT:22,01
6N	Neg	6E	Tm: 77,47 CT:21,45	6B	Tm: 74,18 CT:23,59
7N	Neg	7E	Tm: 74,48 e 77,6 CT:33,2	7B	Tm: 74,63 CT:22,57
8N	Neg	8E	Tm: 74,63 CT:30,58	8B	Tm: 74,63 CT:24,85
9N	Neg	9E	Tm: 77,47 CT:35,16	9B	Tm: 74,78 CT:25,97
10N	Tm: 74,33 CT:35,06	10E	Tm: 77,47 CT:33,44	10B	Tm: 74,78 CT:23,06
11N	Neg	11E	Tm: 77,62 CT:26,51	11B	Tm: 74,78 e 77,6 CT:23,49
12N	Neg	12E	Tm: 77,62 CT:23,16	12B	Tm: 74,78 CT:23,4
13N	Neg	13E	Tm: 77,62 CT:29,79	13B	Tm: 74,93 CT:23,98
14N	Tm: 77,47 CT:21,56	14E	Tm: 74,7 e 77,47 CT:24,43	14B	Tm: 74,93 CT:26,53
30N	Neg	15E	Tm: 77,32 CT:37,03	15B	Tm: 74,78 CT:22,51
		16E	Tm: 74,48 CT:34,51	16B	Tm: 74,63 CT:23,42
		17E	Neg	17B	Tm: 74,48 CT:22,85
		18E	Tm: 74,48 CT:30,9	18B	Tm: 74,48 CT:21,75
		19E	Tm: 77,62 CT:23,7	19B	Tm: 74,63 CT:25,52
		20E	Tm: 77,47 CT:24,66	20B	Tm: 74,63 CT:22,9
		21E	Tm: 77,62 CT:33,35	21B	Tm: 74,78 CT:25,97
		22E	Tm: 77,77 CT:23,89	22B	Tm: 74,78 CT:25,74
		23E	Tm: 74,78 CT:20,4	23B	Tm: 74,93 CT:24,44

Tabela 6. Continuação.

		24E	Tm: 77,62 CT:24,57	24B	Tm: 74,78 CT:21,73
--	--	-----	-----------------------	-----	-----------------------

25E	Tm: 77,77 CT:21,28	25B	Tm: 74,78 CT:23,87
26E	Tm: 77,62 CT:23,49	26B	Tm: 74,78 CT:23,29
27E	Tm: 74,7 e 77,02 CT: 34,17	27B	Tm: 74,78 CT:23,59
28E	Tm: 77,47 CT:27,36	28B	Tm: 74,63 CT:23,05
29E	Neg	29B	Tm: 74,63 CT:21,83
30E	Tm: 77 CT:29,83	30B	Tm: 74,63 CT:21,49
31E	Tm: 77,47 CT:35,19	31B	Tm: 74,48 CT:24,96
32E	Tm: 77,77 CT:22,95	32B	Tm: 74,78 CT:22,82
33E	Tm: 77,77 CT:27	33B	Tm: 74,78 CT:23,96
34E	Tm: 77 CT:33,82	34B	Tm: 74,78 CT:21,52
35E	Tm: 77,62 CT:26,13	35B	Tm: 74,78 CT:26,39
36E	Tm: 75,38 e 77,15 CT:35,17	36B	Tm: 77,77 CT:25,28
37E	Neg	37B	Tm: 74,33 CT:34,84
38E	Tm: 77,47 CT:35,19	M1	Tm: 74,63 CT:30,93
39E	Tm:77,77 CT:31,74	M2	Tm: 74,98 e 77,92 CT: 22,97
40E	Tm: 77,77 CT:29,48		

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Anaplasma platys* DETECTADO EM UM CÃO DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

LISBÔA, Raquel Silva. **Caracterização Molecular de *Anaplasma platys* Detectado em um Cão da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil.** Seropédica, 2010. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

Anaplasma platys é uma rickettsia Gram-negativa, intracelular obrigatória, que parasita trombócitos de cães, sendo responsável pela enfermidade denominada trombocitopenia cíclica canina. A espécie de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é incriminada como principal vetor. O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma cepa de *A. platys* detectada em um cão na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. A amostra de sangue de um cão, SRD, foi coletada com EDTA e submetida à análises hematológicas. O hemograma indicou anemia, trombocitopenia e ao exame microscópico do esfregaço sanguíneo foram observadas mórulas em plaquetas sugestivas de *A. platys*. O DNA genômico foi extraído para a realização de PCR utilizando primers para a região 16S rRNA de *Ehrlichia*. A amplificação foi realizada em um termociclador automatizado como segue: 94° por 3 min.; os 35 ciclos seguintes foram a 94°C por 1 min., 67,5°C por 1 min., 72°C por 30 seg., com uma extensão final de 7 min. a 72°C. O produto resultante da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, visualizado através de transiluminador U.V. e fotografado. Utilizou-se o programa BLASTn para confrontar a sequência consenso de ácido nucleotídeos obtida com sequências previamente depositadas no GenBank. O tamanho do produto obtido na PCR foi de aproximadamente 473pb, como esperado. Para confirmar o resultado da PCR e identificar o agente infeccioso em nível de espécie, este produto foi clonado em vetor pGEM-T e sequenciado. Por meio da técnica de sequenciamento obteve-se uma sequência consenso de 432pb, que apresentou 99% de identidade com a cepa de *A. platys* da Tailândia (EF139459), com apenas uma substituição de nucleotídeo na posição 35 que apareceu por meio de uma transição G/A, e também, mostrou similaridades com sequências do gene 16S rRNA de diversas regiões geográficas. A sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA da cepa de *A. platys* da cidade do Rio de Janeiro encontrada neste estudo foi depositada no GenBank com o número de acesso FJ755157. O isolamento de uma nova sequência parcial do gene 16S rRNA de *A. platys* localizada em outra região geográfica brasileira marca uma contribuição para o estudo da diversidade genética desta espécie.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*, Clonagem, Sequenciamento.

ABSTRACT

LISBÔA, Raquel Silva. **Molecular Characterization of *Anaplasma platys* Detected in a Dog of the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil.** Seropédica, 2010. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

Anaplasma platys it is a Gram-negative, obligate intracellular rickettsial organism that parasitize platelets of dogs, being responsible for the illness named canine infectious cyclic thrombocytopenia. *Rhipicephalus sanguineus* tick species is incriminated as the main vector. The aim of the present study was to characterize *A. platys* strain detected in a dog from Rio de Janeiro city, Brazil. Sample of a dog blood, SRD, was collected with EDTA-anticoagulated, and submitted hematological analysis. The hemogram showed anemia, thrombocytopenia, and morules in platelets were observed during blood smear evaluation, suggesting infection with *A. platys*. Genomic DNA was extracted for PCR using *Ehrlichia* primers sets based on region 16S rRNA. The amplification was performed in an automated DNA thermal cycler. Amplification was performed under the following conditions: 94°C for 3 min., followed by 35 amplification cycles at 94°C for 1 min., 67.5°C for 1 min., and 72°C for 30 sec., with a final extension step at 72°C for 7 min. PCR product was separated by electrophoresis through 1.0% agarose gel, stained with ethidium bromide, visualized at U.V. illumination, and photographed. We used the program BLASTn to confront the consensus sequence of nucleotide acids obtained with the sequences previously deposited in GenBank. Product size obtained at PCR was approximately 473 bp, as expected. To confirm the PCR result and identify the infectious agent at the species level, the PCR product cloned into the pGEM-T vector, and sequenced. Through the technique of sequencing obtained a consensus sequence of 432 bp that showed 99% identity to *A. platys* strain from Thailand (EF139459), with only one nucleotide substitution at position 35 that appeared through a G/A transition, and also showed close similarities to 16S rRNA gene sequences from various geographic regions. The partial 16S rRNA nucleotide sequence of the *A. platys* strain from Rio de Janeiro city was introduced in GenBank with accession number FJ755157. The isolation of a new *A. platys* partial 16S rRNA gene sequence located in another geographic Brazilian region marks a contribution to the study of genetic diversity of this species.

Key words: *Anaplasma platys*, Cloning, Sequencing.

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma platys é uma rickettsia Gram-negativa, intracelular obrigatória, que parasita trombócitos circulantes de cães, sendo responsável pelo aparecimento de um quadro clínico denominado trombocitopenia cíclica canina (TCC) (HARRUS et al., 1997a; HUANG et al., 2005). A primeira descrição ocorreu nos Estados Unidos da América por Harvey et al. (1978), que visualizaram, em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, corpúsculos de inclusão basofílicos em plaquetas de cães trombocitopênicos, sendo inicialmente nomeado *Ehrlichia platys*.

Em 2001, uma considerável reorganização na classificação de organismos ocorreu na ordem Rickettsiales. *Ehrlichia platys* foi descoberta como sendo mais proximamente relacionada com as espécies de *Anaplasma* e foi renomeada *A. platys* (DUMLER et al., 2001). Muitos autores têm encorajado pesquisas adicionais sobre a análise da variação genética das cepas de *A. platys* no mundo todo (DE LA FUENTE et al., 2006; CARDOSO et al., 2007).

Estudos epidemiológicos para verificação da distribuição geográfica de *A. platys* são escassos, mas presume-se que sua distribuição geográfica seja semelhante à de outras espécies de Rickettsias (BRADFIELD et al., 1996). Já foi relatado em diversos países, como China (CHANG et al., 1996), Israel (HARRUS et al., 1997a), Grécia (KONTOS et al., 1991), França, Itália, Japão (INOKUMA et al., 2002), Tailândia, Venezuela (BROWN et al., 2001 - Austrália), em várias regiões do Brasil (MACHADO, 2004) e principalmente nos Estados Unidos. Neste país, French e Harvey (1978) e Hoskins et al. (1988) verificaram a exposição canina ao agente em várias localidades ao pesquisarem a presença de anticorpos séricos anti-*A. platys*.

O modo natural de transmissão da doença ainda não foi conclusivamente determinado, mas o DNA deste agente foi amplificado de espécies dos carrapatos *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (INOKUMA et al., 2000; PAROLA et al., 2003). Entretanto, a transmissão experimental de *A. platys* com estas espécies de carrapatos ainda não foi demonstrada (SIMPSON et al., 1991). Abarca et al. (2007) ao diagnosticar infecção por *A. platys* em cães no Chile, relataram que devido ao fato de *R. sanguineus* ser a única espécie de carrapato que infesta cães em Santiago (GONZÁLEZ-ACUÑA; GUGLIELMONE, 2005), seus resultados apoiavam a conclusão de que esta é a espécie vetora deste agente no Chile.

Os cães são os hospedeiros mamíferos mais comuns, embora raros relatos de infecções em gatos (SANTARÉM et al., 2005), impalas e ovelhas tenham sido documentados (DU PLESSIS et al., 1997).

A doença é caracterizada por trombocitopenia severa ocorrendo em intervalos regulares, frequentemente assintomáticos (KONTOS et al., 1991; WILSON, 1992). A maioria dos cães com infecção natural possui uma doença clínica branda, embora possam ocorrer sinais clínicos mais severos como febre, letargia, membranas mucosas pálidas, hemorragias petequiais, epistaxe e linfadenopatia. Como outras doenças transmitidas por carrapatos, a coinfeção de *A. platys* com outros agentes infecciosos tais como espécies de *Ehrlichia*, *Bartonella*, ou *Borrelia* ocorre com frequência, o que pode resultar em manifestações mais severas da doença clínica (HARVEY, 1998; BREITSCHWERDT, 2000).

Experimentalmente, os sinais clínicos aparecem entre oito e 14 dias após a inoculação (HARVEY et al., 1978). O organismo aparece nas plaquetas circulantes, resultando em uma trombocitopenia severa, tipicamente $<20.000/\mu\text{l}$. As contagens de plaquetas usualmente permanecem abaixo de $20.000/\mu\text{l}$ por apenas um ou dois dias. Os organismos desaparecem rapidamente do sangue periférico, e as contagens de plaquetas aumentam rapidamente, alcançando um valor normal em três ou quatro dias. Subsequentemente, os organismos reaparecerão em intervalos de uma a duas semanas, e o processo se repete, resultando em uma

trombocitopenia cíclica. A percentagem de plaquetas parasitadas e a severidade dos episódios trombocitopênicos diminuem com subsequentes ciclos de parasitemia (ALLEMAN, 2008).

O diagnóstico da infecção por *A. platys* usualmente tem sido realizado por microscopia, pela visualização de inclusões basofílicas dentro de plaquetas em esfregaços de sangue total ou de papa de leucócitos corados com derivados de Romanowsky (HARVEY et al., 1978; WOODY; HOSKINS, 1991; MARTIN et al., 2005). Entretanto, devido à parasitemia cíclica da doença, ocorre uma baixa frequência de parasitos nos esfregaços sanguíneos, principalmente nas fases de trombocitopenia, o que torna esse método de diagnóstico falho por não ser confiável (HARVEY et al., 1978; FRENCH; HARVEY, 1983; HARRUS et al., 1997a).

Estudos sorológicos utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com plaquetas infectadas com *A. platys* como antígeno são muito úteis no diagnóstico (FRENCH; HARVEY, 1983; BAKER et al., 1987). Embora, os testes sorológicos, em geral, sejam limitados pela deficiência na detecção de infecções agudas, na dificuldade de diferenciar infecção por exposição primária e pela possibilidade de ocorrer reação cruzada entre as espécies (IQBAL et al., 1994; SHAW et al., 2001). Além disso, os animais recuperados podem permanecer soropositivos por longos períodos, tornando difícil diferenciar animais ativamente infectados de convalescentes (MATHEW et al., 1997).

Os antígenos de *A. platys* não reagem com os anticorpos do soro de cães infectados com *E. canis* na RIFI (FRENCH; HARVEY, 1983; WANER et al., 2001), mas ocorre reação cruzada com anticorpos anti-*A. phagocytophilum* (INOKUMA et al., 2002).

A PCR também tem sido utilizada no diagnóstico por ser um teste sensível, específico e rápido, que detecta infecções naturais e experimentais por *A. platys* em cães (CHANG; PAN, 1996; CHANG et al., 1997; MYLONAKIS et al., 2003; MARTIN et al., 2005). De acordo com De La Fuente et al. (2006), o teste da PCR, confirmado pela análise de sequências de “amplicons”, é considerado o teste diagnóstico para *A. platys* mais confiável até o momento.

O tratamento para a anaplasmose canina é o mesmo para as outras infecções com espécies de *Ehrlichia* - doxiciclina. A dose ótima e o tempo de terapia ainda não foram firmemente estabelecidos, mas tem sido recomendada uma dosagem oral de 5 a 10mg/kg dada duas vezes ao dia por 30 dias (BREITSCHWERDT, 1998b). Na maioria dos casos, os sinais clínicos se resolvem rapidamente. Os cães, usualmente, têm uma melhora marcante cerca de 24 a 48 horas após a terapia ter sido instituída, e o prognóstico para a recuperação clínica é excelente (GREIG; ARMSTRONG, 2006).

Animais com *A. platys* circulante que possuem doença clínica moderada a severa ou que não respondem rapidamente ao tratamento com doxiciclina devem ser testados para outras doenças transmitidas por carrapatos (ALLEMAN, 2008).

Diversos pesquisadores têm realizado e estimulado estudos moleculares sobre a variação genética das cepas de *A. platys* de diferentes continentes do mundo. Unver et al. (2003) ao analisarem a sequência do gene 16S rRNA de um cão infectado por *A. platys* no Japão, encontraram semelhanças com sequências da França, Venezuela e Tailândia, indicando haver baixa diversidade entre as cepas de *A. platys* obtidas de várias regiões geográficas.

Huang et al. (2005) relataram que a sequência 16S rRNA da cepa encontrada na cidade de Lara era diferente de outra cepa da venezuelana da cidade de Maracaibo, com isto, sugeriram que existem pelo menos duas cepas de *A. platys* circulando na Venezuela. Segundo estes autores, as semelhanças entre o gene 16S rDNA de *A. platys* de diferentes localizações à nível mundial apóia a hipótese de que as cepas de *A. platys* não são segregadas geograficamente.

Martin et al. (2005) ao analisar sequências de 345pb de dez amostras de DNA de cães positivos para *A. platys*, descobriram uma semelhança de 99,7 a 100% com a cepa de *A. platys* (AF286699) encontrada na Tailândia por Suksawat et al. (2001).

De La Fuente et al. (2006) realizaram um estudo objetivando caracterizar cepas de *A. platys* em cães de Palermo, na Sicília, Itália, utilizando uma combinação de PCR e análises de sequências dos genes 16S rDNA, operon de choque térmico *groESL* e citrato sintase (*gltA*). Estes autores identificaram pelo menos três cepas diferentes de *A. platys*.

Cardoso et al. (2007) compararam a sequência de DNA parcial do gene 16S rRNA de *A. platys* detectado em cães de Ribeirão Preto, Brasil com sequências de outras cepas previamente depositadas no GenBank. Este estudo mostrou que existem pelo menos três cepas de *A. platys* circulando na América do Sul.

Pinyoowong et al. (2008) realizaram análises filogenéticas do gene 16S rRNA de uma nova cepa de *A. platys* da cidade de Bangkok e esta sequência mostrou estreita relação com um relato anterior de *A. platys* da Tailândia (SUKSAWAT et al., 2001) sugerindo que pode haver pelo menos duas cepas de *A. platys* enzoóticas para a Tailândia.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de um isolado de *A. platys* detectado em um cão na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem da Amostra

Foram analisadas amostras de sangue total provenientes da rotina de dois laboratórios localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, durante o período de junho de 2007 a fevereiro de 2008. Estas amostras foram coletadas de cães de diferentes raças e idade, por meio de venopunção radial, acondicionadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e mantidas sob refrigeração a 4°C até o processamento de seu hemograma completo, realizado sempre no mesmo dia da coleta.

Dentre dez amostras (21E, 26E, 27E, 29E, 30E, 31E, 34E, 37E, 38E e 39E) que apresentaram inclusões e ou mórulas plaquetas em seu diagnóstico parasitológico por meio do exame de esfregaços sanguíneos, uma (31E) foi selecionada para confirmação por meio da técnica de PCR e do sequenciamento.

2.2 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo elaborado por Sambrook e Russel (2001), com modificações (Anexo A). Todos os reagentes utilizados no processo de extração foram da marca SIGMA[®].

A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foram determinados por espectrofotômetro (Biorad), sob absorvância de 280nm (Anexo B).

2.3 Reação de PCR para o Gene 16S rRNA

Utilizou-se os oligonucleotídeos ECC (senso ou “forward”) (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') e ECB (anti-senso ou “reverse”) (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 478 pares de base (pb) do gene 16S rRNA de organismos rickettsiais (incluindo *Ehrlichia* spp, *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum*) e algumas poucas bactérias (DAWSON et al., 1994, 1996; WEN et al., 1997).

Para a reação de PCR foram utilizados 1,0µL de DNA genômico (77ng), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, tampão 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl - pH 8,5), 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec[®]), e 0,2µM de cada primer (Promega[®], Madison, WI, USA) em um volume total de 25µL. As misturas foram preparadas em câmara de fluxo laminar vertical (Trox[®] technik), a fim de evitar riscos de contaminação. As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf[®], USA) com o seguinte programa de amplificação: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 67,5°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 30 segundos, e um passo extensão final a 72°C por 7 minutos.

2.4 Análise do Produto Amplificado

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen[®]) por aproximadamente uma hora a 90volts, em cuba horizontal e fonte de alimentação de energia ‘Power Pac Universal’ para eletroforese e sistema de transferência (Biorad[®]), com tampão TAE (1X) como fluido condutor de corrida. Foi aplicado 8µl do produto da amplificação e 2µl de tampão da amostra do tipo III na canaleta do gel. Na

primeira canaleta do gel foi adicionado um padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12000pb (Invitrogen®). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (5µg/µL) (Invitrogen®) por 10 minutos, as bandas foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta (U.V.) em Sistema de Fotodocumentação L-Pix HE (Loccus Biotecnologia®).

2.5 Clonagem do Produto de PCR

Para confirmar o resultado da PCR e identificar a espécie do agente infeccioso, o produto de PCR da amostra 31E foi clonado.

O fragmento de DNA do gene 16S rRNA obtido através de PCR com os iniciadores ECC/ECB, foram inseridos em plasmídeo pGEM®-T Easy Vectors (Promega®, Madison, Wisconsin, USA) (Figura 26), por meio de reação de ligação em microtubos, na seguinte proporção: 1µL de plasmídeo, 3µL do produto de PCR, 1µL da enzima ligase T4, 5µL do tampão da ligase 2X, para um volume final de 10µL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

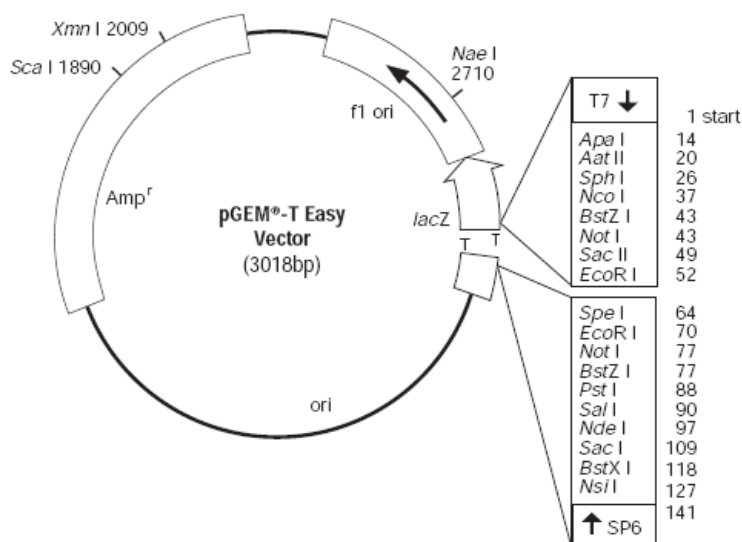


Figura 26. Plasmídeo pGEM®-T Easy utilizado para a clonagem do fragmento de DNA do gene 16S rRNA de isolado cão da cidade do Rio de Janeiro (Fonte: Promega®).

O plasmídeo com o inserto (vetor-inserto) do gene foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* TOP 10 produzidas no Laboratório de Biologia Molecular (EMBRAPA Gado de Corte).

Adicionou-se 10µL do vetor-inserto às células *E. coli* TOP 10, homogeneizou-se levemente, incubando em gelo por 30 minutos. Realizou-se choque térmico de 90 segundos em banho-maria a 42°C e 2 minutos no gelo. A amostra foi levada à câmara de fluxo laminar onde se adicionou 900µL de meio Luria-Bertani (LB), que estava à temperatura ambiente, e posteriormente submetida à agitação horizontal a 37°C por 30 minutos. O produto transformado foi semeado em duas placas de Petri 20 x 24cm devidamente identificadas e à temperatura de 37°C (100µL para cada placa), contendo meio LB ágar com 100µg/mL de

ampicilina, com auxílio de uma alça de vidro. As placas foram incubadas por 12 horas a 37°C para o crescimento das colônias bacterianas.

2.6 PCR de Colônia

Realizou-se PCR de colônia para identificar os clones bacterianos que continham os insertos de interesse, com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene 16S rRNA.

A PCR foi preparada em um volume final de 25µL com 10mM de tris-HCl pH 8,5, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,2µM de cada iniciador, 1,5U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec[®]) e 1 colônia do isolado 31E. Foram escolhidas no total 3 colônias aleatoriamente, as quais foram repicadas e identificadas em uma nova placa de petri contendo meio LB ágar com 100µg/mL de ampicilina. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf[®]) programado para uma temperatura de desnaturação das fitas de DNA a 94°C por 10 minutos e posteriormente 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 67,5°C e 30 segundos a 72°C e, uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para a observação da reação, foi realizada eletroforese conforme o item 2.5.

2.7 Reação de Minipreparação de Plasmídeos (Miniprep)

As células transformadas (item 2.6), previamente selecionadas pela técnica de PCR de colônia (item 2.7), foram transferidas para tubo do tipo Falcon de 50mL contendo 5mL de meio LB com 100mg/mL de ampicilina, e incubadas “overnight” à 37°C sob agitação de 180 rpm. Foram retirados 2mL das células cultivadas, as quais foram transferidas para tubos de microcentrífuga, devidamente identificados e centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante por inversão dos tubos, acrescentou-se mais 2mL para uma nova centrifugação e posterior descarte do sobrenadante e finalmente acrescentou-se o último 1mL para centrifugar e descartar. Realizou-se a purificação de DNA plasmidial replicado conforme o item 2.7, com auxílio do Kit comercial Wizard[®] Plus- SV Minipreps (Promega[®]), conforme especificação do fabricante.

Para análise da qualidade do DNA plasmidial obtido, foi realizada nova eletroforese horizontal, de 3µL do miniprep, em gel de agarose a 1% em TAE sob corrente de 60V.

2.8 Sequenciamento

A amostra obtida na placa de Petri contendo as colônias do isolado foi enviada para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná – Curitiba, PR, onde foi sequenciada, em sequenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems), pelo método dideoxi (Sanger), segundo as recomendações do fabricante. A amostra foi sequenciada com iniciadores específicos do vetor pGEM-T[®].

2.9 Análise Filogenética

A sequência consenso foi submetida à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), para comparação com sequências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI).

Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o método “neighbor-joining” de construção de filogramas e o método de distância Kimura-2-parâmetros, que foram processados pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA-3 (KUMAR et al., 2004) aplicando um “bootstrap” de 1.000 repetições para inferência estatística.

As sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA das bactérias da família Anaplasmataceae utilizadas no estudo filogenético estão disponíveis no GenBank sob os números de acesso: oito cepas de *A. platys* relatadas na França (AF303467), Tailândia (EF139459 e AF286699), China (AF156784), Bélgica (AY821826), Okinawa (AY077619), Venezuela (AF287153) e Estados Unidos (M82801); *A. marginale* (AY048816); *E. ewingii* (M73227); *E. chaffeensis* (U86664); e *E. canis* de Oklahoma (M73221). *Neorickettsia sennetsu* (M73219) foi utilizada como o grupo externo.

Apenas quatro sequências do gene 16S rRNA de *A. platys* isoladas de cães do Brasil estão atualmente disponíveis no GenBank (números de acesso: EF052620, EF052621, EF052622 e DQ401045). Infelizmente, não foi possível colocá-las nesta análise por serem muito curtas e não apresentarem sequências alinháveis, com as sequências obtidas neste estudo, para serem incluídas na presente comparação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do hemograma deste cão revelou trombocitopenia (contagem de plaquetas: $10 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$), anemia (VG: 23%, hemoglobina: 7,5g/dl, contagem de eritrócitos: $3,5 \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$) e corpúsculos de inclusão basofílicos em plaquetas durante a avaliação do esfregaço sanguíneo. Devido à parasitemia cíclica, a detecção de *A. platys* em esfregaços sanguíneos pode ser difícil. Segundo Breitschwerdt (2000) inclusões ou mórulas de *A. platys* são geralmente um achado acidental durante a rotina de exame de esfregaços sanguíneos. Neste caso, o diagnóstico laboratorial foi eficiente.

A amplificação do fragmento do gene 16S rRNA com este par de oligonucleotídeos produziu um produto aproximadamente do tamanho esperado (473pb) (Figura 27).

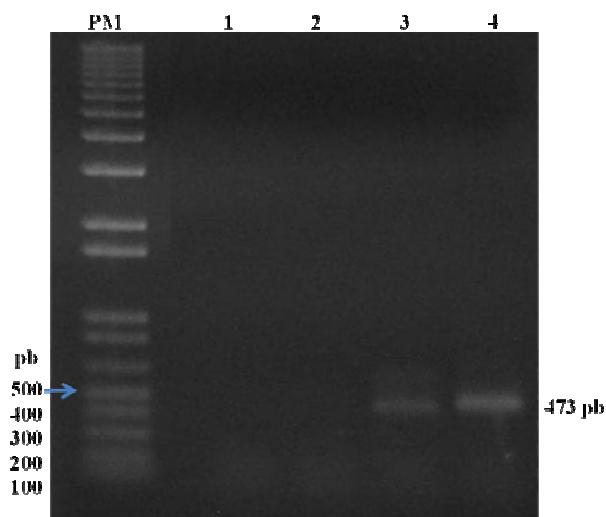


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Resultados obtidos para a amplificação por PCR de uma porção do gene codificador 16S rRNA de *Ehrlichia* ($\approx 473\text{pb}$). [PM]: padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen[®]); [1]: água ultra-pura no lugar da amostra; [2]: amostra negativa (12N); [3]: amostra positiva (29E); [4]: amostra positiva (31E).

Após o sequenciamento do gene 16S rRNA foram obtidas sequências (“forward” e “reverse”), as quais foram alinhadas a fim de obtermos uma sequência consenso de 432pb (Figura 28). A análise do resultado, realizada na base de dados do GenBank BLASTn, mostrou 99% (E value = 0,0) de identidade com a cepa de *A. platys* da Tailândia (número de acesso: EF139459), com apenas uma substituição de nucleotídeo na posição 35 que apareceu por meio de uma transição G/A.

1	AGAACGAACG	CTGGCGGCAA	GCTTAACACA	TGCAGGTCGA	ACGGATTTTT	GTCGTAGCTT
61	GCTATGATAA	AAATTAGTGG	CAGACGGGTG	AGTAATGCAT	AGGAATCTAC	CTAGTAGTAT
121	GGGATAGCCA	CTAGAAATGG	TGGGTAATAC	TGTATAATCC	CTGCGGGGGA	AAGATTTATC
181	GCTATTAGAT	GAGCCTATGT	TAGATTAGCT	AGTTGGTAGG	GTAAGGCCT	ACCAAGGCAG
241	TGATCTATAG	CTGGTCTGAG	AGGATGATCA	GCCACACTGG	AACTGAGATA	CGGTCCAGAC
301	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATATTG	GACAATGGGC	GCAAGCCTGA	TCCAGCTATG
361	CCGCGTGAGT	GAGGAAGGCC	TTAGGGTTGT	AAAAC TCTTT	CAGTGGGGAA	GATAATGACG
421	GTACCCACAG	AA				

Figura 28. Consenso da sequência de *Anaplasma platys* do Rio de Janeiro, Brasil.

A sequência parcial de nucleotídeos do gene 16S rRNA de *A. platys* do Rio de Janeiro (RJ) encontrada neste estudo foi depositada no GenBank com o número de acesso FJ755157.

A análise filogenética (Figura 29) revelou que após a separação do grupo externo, as espécies de *Anaplasma* e *Ehrlichia* se dividiram em dois ramos claramente distintos, mostrando 97% e 95% das topologias geradas pela análise de “bootstrap”, respectivamente. A cepa de *E. canis* de Oklahoma se agrupou sempre em um ramo independente de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (“bootstrap” = 95). As cepas de *A. platys* de diferentes países se agruparam consistentemente em um ramo independente de *A. marginale* (“bootstrap” = 100).

Este resultado está de acordo com dados obtidos por outros autores (UNVER et al., 2003; HUANG et al., 2005; MARTIN et al., 2005; AGUIRRE et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2006; PINYOOWONG et al., 2008) que, com base nas semelhanças entre as sequências do gene 16S rRNA de várias regiões geográficas, sugerem haver uma baixa diversidade genética entre as diferentes cepas de *A. platys*.

Pelo alinhamento das sequências do gene 16S rRNA de *A. platys* do Brasil, foi possível verificar uma região consenso menor do que aproximadamente 300pb. A sequência brasileira DQ401045 foi a que mais diferiu da sequência obtida neste estudo, porque teve três nucleotídeos diferentes.

São necessários mais estudos com sequências de cepas brasileiras para realizar análises filogenéticas mais detalhadas, porque as sequências já existentes, até o momento, são muito curtas para esta análise. Os métodos de diagnóstico molecular permitem a detecção direta do agente etiológico e análises de sequências facilitam sua identificação e comparação com cepas geograficamente diversas.

O isolamento de uma nova sequência parcial do gene 16S rRNA de *A. platys* localizada em outra região geográfica brasileira marca uma contribuição ao estudo da diversidade genética desta espécie.

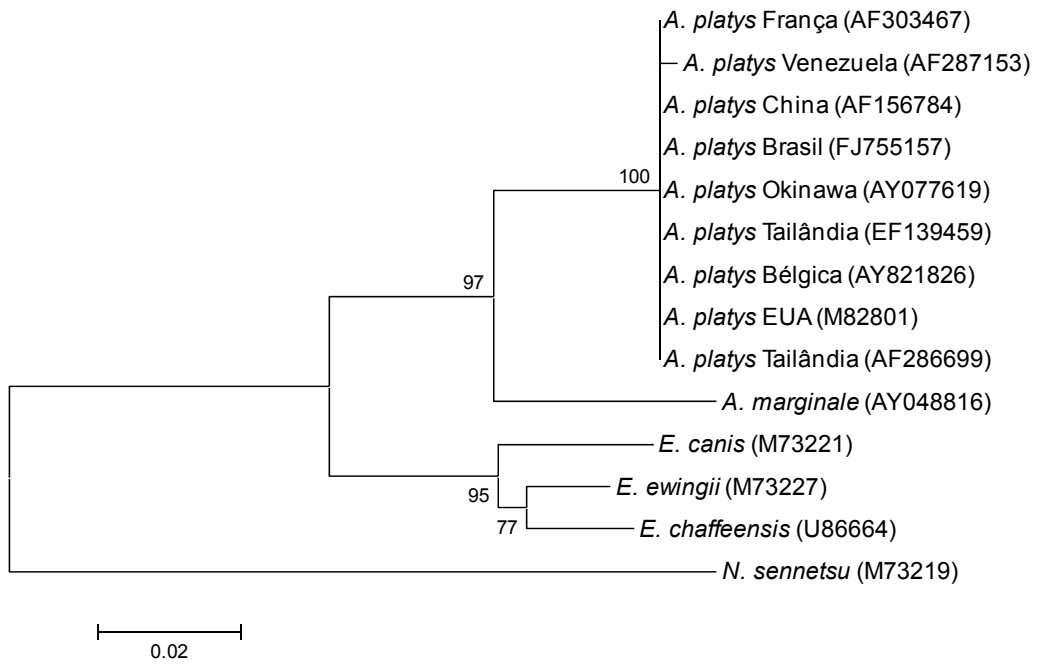


Figura 29. Árvore Filogenética baseada em seqüências parciais do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* e *Anaplasma*, utilizando *N. sennetsu* como grupo externo. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “neighbor-joining” com “bootstrap” de 1.000 repetições, realizado pelo programa MEGA3.

3 CONCLUSÕES

- 1 – Foi possível realizar a detecção simultânea do DNA de *Ehrlichia* e *Babesia* de apenas uma amostra naturalmente coinfetada por meio da técnica de PCR multiplex;
- 2 – A PCR multiplex em tempo real se mostrou mais eficiente em detectar as infecções únicas e coinfeções entre *Ehrlichia* e *Babesia*;
- 3 – O sequenciamento permitiu a confirmação dos amplicons obtidos de algumas amostras para *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*;
- 4 – O agrupamento filogenético pelo estudo de fragmentos dos genes 16S rRNA e 18S rRNA das sequências obtidas permitiu a realização de uma caracterização parcial das espécies de *E. canis*, *A. platys*, *B. canis* e *H. canis* obtidas neste estudo;
- 5 – O agente *Anaplasma platys* está presente na cidade do Rio de Janeiro.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, S. U.; MOHAMMED, A. R.; TRIMNEL, A.; SANNUSI, A.; ALAFIATAYO, R. Clinical and hematological findings in seventy naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 145-147, 1990.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.44, n.1, p. 126-132, 2007a.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007b.

AGUIRRE, E. TESOURO, M. A.; RUIZ, L.; AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, n.4, p. 197–200, 2006.

ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 43-49, 2005.

ALLEMAN, A.R.; WAMSLEY, H.L. An update on anaplasmosis in dogs. **Veterinary Medicine**, v.103, n.4, p.212-214, 216, 220, 2008.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (Donatien; Lestoquard, 1935): **Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 197 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração: Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. 135p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina - Revisão. **Clínica Veterinária**. A. IV, n. 19, p. 31-38, 1999.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A.; SULZER, A. J. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 12, p. 2102-2105, 1980.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D. C.; WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2838-2842, 1991.

ANDERSON, B. E.; GREENE, C. R.; JONES, D. C.; DAWSON, J. E. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 299-302, 1992a.

ANDERSON, B. E.; SUMNER, J. W.; DAWSON, J. E.; TZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H.; AZAD, A. F. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992b.

ANO, H.; MAKIMURA, S.; HARASAWA, R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 1, p. 111-113, 2001.

ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A. C.; ZAPPA, V. *Babesia canis*: Relato de Caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII, n. 12, 2009.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia VIII Lista e chave para representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.

BABÉS, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 107, p. 692, 1888.

BAKER, D. C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 5, p. 449-53, 1987.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S.; CHEN, S. M.; ECKMAN, M. R.; VAN ETTA, L. L.; WALKER, D. H. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States: a new species emerging? **Journal of the American Medical Association**, v. 272, n. 3, p. 212-218, 1994.

BANETH, G.; AROCH, I.; PRESENTEY, B. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 1-3, p. 201-206, 1997.

BARKER, R. H.; BANCHONGAKSON, T.; COURVAL, J. M.; SUWONKERD, W.; RIMWUNG TRAGOON, K.; WIRTH, D. F. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 41-49, 1994.

- BASTOS, C. V.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L. M. Retrospective study (1998–2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 158-160, 2004.
- BÉLANGER, M.; SORENSON, H. L.; FRANCE, M. K.; BOWIE, M. V.; BARBET, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; ALLEMAN, A. R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3506-3508, 2002.
- BENSON, D. A.; MIZRACHI, I. K.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; SAVARY, K. C. M.; GAGER, R. B.; BREITSCHWERDT, E. B. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 2, p. 125-128, 1999.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M.; BREITSCHWERDT, B. Development of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 4, p. 494-498, 2004a.
- BLEIDORN, C.; VOGT, L.; BARTOLOMAEUS, T. New insights into polychaete phylogeny (Annelida) inferred from 18S rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 279-288, 2003.
- BOBADE, P. A.; ODUYE, O. O.; AGHOMO, H. O. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* infections in dogs. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 39, n. 2, p. 185-188, 1989.
- BOOL, P. H.; SUTMOLLER, P. *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 418-420, 1957.
- BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.
- BOULOY, R.; LAPPIN, M.; HOLLAND, C.; THRALL, M. A.; BAKER, D.; O'NEIL, S. S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, p. 1475-1478, 1994.
- BRACCINI, G. L.; CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAUJO, F. A. P.; SANTOS, N. R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 1986-1990. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 20, p. 134-149, 1992.
- BRADFIELD, J. F.; VORE, S. J.; PRYOR, Jr., W. H. *Ehrlichia platys* infection in dogs. **Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 565-568, 1996.

BREITSCHWERDT, E. B. Babesiosis. In: GREENE, R. T. (Ed.). **Enfermedades infecciosas de los perros y gatos**. México: Interamericana, 1993. p. 834-841.

BREITSCHWERDT, E. B.; NICHOLSON, W. L.; KIEHL, A. R.; STEERS, C.; EUTEN, D. J.; LEVINE, J. F. Natural infections with *Borrelia spirochetes* in two dogs from Florida. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 352-353, 1994.

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, 1998b.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.) **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 2000. v. 1, chap. 86, p. 400-408.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. cap. 1, p. 14.

BROWN, G. K.; CANFIELD, P. J.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K.; MARTIN, A. R.; BROWN, C. S.; IRVING, R. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 9, p. 321-325, 2006.

BRUMPT, E. Cycle évolutif de *Piroplasma canis* chez les Ixodines. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie**, v. 124, p. 928-931, 1937.

BRUMPT, E. Identification des piroplasmes du chien du type *Piroplasma canis*. Transmission de la souche Française par la tique sud-africaine *Haemaphysalis leachi*. Faible valeur des épreuves d'immunité croisée dans les piroplasmoses. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 16, p. 97-116, 1938.

BUHLES, W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 130, p. 357-367, 1974.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO Jr., J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

CACCIÒ, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. R.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 285-292, 2002.

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.; GALVA O, M. A.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.3, p. 259–262, 2004.

CAMACHO, A. T.; PALLAS, E.; GESTAL, J. J.; GUITIAN, F. J.; OLMEDA, A. S.; GOETHERT, H. K.; TELFORD, S. R. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. **Veterinary Record**, v. 149, n. 18, p. 552-555, 2001.

CARDOSO, G. P.; OLIVEIRA, L. P.; ZISSOU, V. G.; DONINI, I. A. N.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 478-479, 2007.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CARRILO, B. J.; REZENDE, H. E. B.; MASSARD, C. L. Ehrlichiose canina no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, v. 15, 1976. **Anais...** Rio de Janeiro: Tipografia Baptista de Souza - Editores, 1978. p. 162.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.

CASAPULLA, R.; BALDI, L.; AVALLONE, V.; SANNINO, R.; PAZZANESE, L.; MIZZONI, V. Canine piroplasmiasis due to *Babesia gibsoni*: clinical and morphological aspects. **Veterinary Record**, v. 142, n. 7, p. 168-169, 1998.

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

Centro Nacional para Informação Biotecnológica. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 23, p. 11141- 11156, 1988.

CHANG, A. C.; CHANG, W. L.; LIN, C. T.; PAN, M. J.; LEE, S. C. Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 5, p. 473-476, 1996.

CHANG, W. L.; PAN, M. J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3142-3146, 1996.

CHANG, W. L.; SU, W. L.; PAN, M. J. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 9, p. 849–851, 1997.

CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S.; WALKER, D. H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 589-595, 1994.

CHOR, B.; TULLER, T. Maximum likelihood of evolutionary trees: hardness and approximation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 97-106, 2005.

CITARD, T.; MAHL, P.; BOULOUIS, H. J.; CHAVIGNY, C.; DRUILHE, P. *Babesia canis*: evidence for genetic diversity among isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. **Tropical Medical Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 172-179, 1995.

CLUSTALW. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 863-884, 2003.

CONRAD, P. A.; THOMFORD, J. W.; YAMANE, I.; WHITING, J.; BOSMA, L.; UNO, T.; HOLSHUH, H. J.; SHELLY, S. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 5, p. 601-605, 1991.

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COURTNEY, J. W.; KOSTELNIK, L. M.; ZEIDNER, N. S.; MASSUNG, R. F. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 7, p. 3164-3168, 2004.

COWEL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 2 ed. St. Louis: Mosby, 1999. 338 p.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBACARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 173-194, 2003.

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.

DANTAS-TORRES, F.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; Coinfection by *Anaplasma platys*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in a dog from Recife, Pernambuco, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 371, 2004a.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004b.

DAVOUST, B.; MACKOWIAK; MOREAU, Y Ehrlichiose canine. Enquete épidémiologic. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 162, n. 4, p. 471-475, 1986.

DAWNSON, J. E.; EWING, S. A. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 8, p. 1322-1327, 1992.

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.

DAWSON, J. E.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W.; WARNER, C.; BIGGIE, K. L.; DAVIDSON, W. R.; LOCKHART, J. M.; NETTLES, V. F.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2725-2728, 1994.

DAWSON, J. E.; BIGGIE, K. L.; WARNER, C. K.; COOKSON, K.; JENKINS, S.; LEVINE, J. F.; OLSON, J. G. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human disease, in dogs from southeast Virginia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 8, p. 1175-1179, 1996.

DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; NICOSIA, S.; ALONGI, A.; MANTIA, F.; KOCAN, K. M. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 24-28, 2006. <<http://www.biomedcentral.com/bmcVetres/2>>

DELL' PORTO, A.; OLIVEIRA, M. R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo. Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existente in Algérie d'une *Rickettsia* du chien. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DOOLITTLE, W. F. Phylogenetic Classification and the Universal Tree. **Science**, v. 284, n. 5423, p. 2124-2128, 1999.

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.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHERDT, E. B.; TANG, Y-W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DUARTE, S. C.; LINHARES, G. F. C.; ROMANOWSKY, T. N.; SILVEIRA NETO, O. J.; BORGES, L. M. F. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1-2, p. 16-20, 2008.

DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J. E. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic ehrlichia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, 1995.

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*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DU PLESSIS, L.; REYERS, F.; STEVENS, K. Morphological evidence for infection of impala, *Aepyceros melampus*, platelets by a rickettsia-like organism. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 317-318, 1997.

EDDLESTONE, S. M.; NEER, T. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R.; GILL, A.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 840-844, 2006.

ENG, T. R.; GILES, R. Ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 4, p. 497-499, 1989.

ENG, T. R.; HARKESS, J. R.; FISHBEIN, D. B.; DAWSON, J. E.; GREENE, C. N.; REDUS, M. A.; SATALOWICH, F. T. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. **Journal of American Medical Association**, v. 264, n. 17, p. 2251-2258, 1990.

EREMEEVA, M.; BALAYEVA, N.; ROUX, V.; IGNATOVICH, V.; KOTSINJAN, M.; RAOULT, D. Genomic and proteomic characterization of strain S, a rickettsia isolated from *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Armenia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2738-2744, 1995.

EUZÉBY, J. Sur la taxonomie des hémospories. Cas des piroplasmés. **Sciences Vétérinaires Médecine Comparee**, v. 90, p. 181-200, 1988.

EWING, S. A. Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 503-506, 1963.

EWING, S. A.; BUCHNER, R. G. Manifestations of Babesiosis, Ehrlichiosis, and Combined Infections in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, n. 113, p. 815-828, 1965.

EWING, S. A. Canine ehrlichiosis, **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 13, p. 331-353, 1969.

EWING, S. A.; PHILIP, C. B. *Ehrlichia* –Like Rickettsiosis in dogs in Oklahoma and its relations to *Neorickettsia helminthoeca*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 116, p. 67-69, 1966.

EWING, S. A.; ROBERTSON, W. R.; BUCHNER, R. G.; HAYAT, C. S. New strain of *Ehrlichia canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, p. 1771-1774, 1971.

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. M. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; AZEVEDO, R. R. M.; RODRIGUES, I. L. F.; ALMOSNY, N. R. P. Avaliação da Ocorrência de Reação Cruzada em Cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* Testados em ELISA Comercial para Detecção de Anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 5-8, 2008.

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n 1-2, p. 69-81, 1993.

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.

FISHBEIN, D. B.; KEMP, A.; DAWSON, J. E.; GREENE, N. R.; REDUS, M. A.; FIELDS, D. H. Human ehrlichiosis: prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 160, n. 5, p. 803-809, 1989.

FISHBEIN, D. B.; DAWSON, J. E.; ROBINSON, L. E. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, n. 9, p. 736-743, 1994.

FÖLDVÁRI, G.; HELL, É.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 221-226, 2005.

FORLANO, M. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO, K. S. C.; FERNANDES, K. R.; LINHARES, G. F. C.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 21-30, 2007.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, Jr., P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 166-170, 1992.

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2407-2411, 1983.

- FUJITA, S. I.; SENDA, Y.; NAKAGUCHI, S.; HASHIMOTO, T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3617-3622, 2001.
- FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SHIGENO, S.; KIMBITA, E.; IGARASHI, L.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; XUAN, X. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 977-981, 2001.
- FUKUMOTO, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; XUAN, X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infection in dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 1031-1035, 2005.
- GIBSON, U.; HEID, C.; WILLIAMS, P. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.
- 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.
- GONDIN, L. F. P.; KONAYAGAWA, A.; ALENCAR, N. X.; BIONDO, A. W.; TAKAHIRA, R. F.; FRANCO, S. R. V. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 319-323, 1998.
- GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of Chile. **Experimental and Applied Acarology**, v. 35, n. 1-2, p. 147-63, 2005.
- GORAB, E. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. 202 p.
- GOSSETT, K. A.; GAUNT, S. D.; AJA, D. S. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 21, p. 265-267, 1985.
- GRAY, J. S. Tick-borne pathogen interactions. **The Infectious Disease Review**, v. 1, n. 2, p. 117-119, 1999.
- 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, 1990. p. 405-414.
- GREIG, B.; ASANOVICH, K. M.; ARMSTRONG, P. J.; DUMLER, J. S. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 44-48, 1996.
- GREIG, B.; ARMSTRONG, P. J. Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3ed. St. Louis, Mo: Saunders, 2006. p. 219-224.

GROVES, M. G., DENNIS, G. L. *Babesia gibsoni*: field and laboratory studies of canine infections. **Experimental Parasitology**, v. 31, p. 153–159, 1972.

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**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GUGLIELMONE, A. A.; LUGARESI, C. I., VOLPOGNI, M. M.; ANZIANI, O. S.; VANZINI, V. R. Babesial antibody dynamics after cattle immunization with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescence test. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 1-3, p. 33-39, 1997.

GUIMARÃES, J. C.; ALBERNAZ, A. P.; MACHADO, J. A.; JUNIOR, O. A. M.; GARCIA, L. N. N. Aspectos clínico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos do Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 229, 2004.

HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B.; PITULLE, C. Differentiation of *Ehrlichia platys* and *E. equi* infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4577-4578, 2001.

HARMELIN, A.; DUBEY, J. P.; YAKOBSON, B.; NYSKA, A.; ORGAD, U. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 43, n. 1-2, p. 131-136, 1992.

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.; 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.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HAUSCHILD, S.; SHAYAN, P.; SCHEIN, E. Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. **Parasitology Research**, v. 81, n. 8, p. 638-42, 1995.

HAYDEN, J. D.; HO, S. A.; HAWKEY, P. M.; TAYLOR, G. R.; QUIRKE, P. The promises and pit falls of PCR. **Veterinary Med. Microbiology**, v. 2, p. 129-137, 1991.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HELFENBEIN, K. G.; BOORE, J. L. The mitochondrial genome of *Phoronis architecta* - comparisons demonstrate that phoronids are Lophotrochozoan protostomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 153-157, 2004.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **Bio Techniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

HEYMAN, P.; DUH, D.; VAN DER KUYLEN, B.; COCHEZ, C.; VAN ESBROECK, M.; VANDENVELDE, C.; AVSIC-ZUPANC, T. Molecular and Serological Evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia* sp. Infection in a Dog, Imported in Belgium, from Southern Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, n. 5, p. 276-279, 2007.

HILDEBRANDT, P. K.; HUXSOLL, D. L.; WALKER, J. S.; NIMS, R. M.; TAYLOR, R.; ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 1309-1320, 1973.

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

<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp>. What is real-time quantitative PCR? Acesso em: 15 fevereiro 2004.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M. J.; ORELLANA, N. G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and Molecular Analysis of *Anaplasma platys* in Dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36, n. 3, p. 211-216, 2005.

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.

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

INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3031-3039, 2001b.

INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 1-2, p. 145-152, 2002.

INOKUMA, H.; YOSHIKAWA, Y.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M. Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 341-346, 2004.

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.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 281-287, 1994.

JAHANGIR, A.; KOLBERT, C.; EDWARDS, W.; MITCHELL, P.; DUMLER, J. S.; PERSING, D. H. Fatal pancarditis associated with human granulocytic ehrlichiosis in a 44-year-old man. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1424-1427, 1998.

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

JAMES, S. P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Scientific Memoirs of Officers of the Medical and Sanitary Department, Government of India New Series**, v. 14, p. 1-12, 1905.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; MUHLNICKEL, C. J.; IRWIN, P. J. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 409-412, 2003.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. PCR-RFLP for detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 20-27, 2007.

JENKINS, A.; KRISTIANSEN, B-E.; ALLUM, A-G.; AAKRE, R. K.; STRAND, L.; KLEVELAND, E. J.; POL, I. van de; SCHOULS, L. *Borrelia burgdorferi* Ssensu Lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* Ticks from Southern Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3666-3671, 2001

JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; GUNNARSSON, A.; MALMQVIST, M.; OLSSON, E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n. 2, p. 109-112, 1995.

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.; HANSEN, R. D.; ANDERSON, B. E.; HANLEY, T. A.; SIMS, K. G.; LIU, L.; BELLAMY, C.; LONG, M. T.; BAEK, B. K. Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 170-175, 1994.

KATSANDE, T. C.; MORE, S. J.; BOCK R. E.; MABIKACHECHE, L.; MOLLOY, J. B.; NCUBE, C. A serological survey of bovine babesiosis in Northern and Eastern Zimbabwe. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 4, p. 255-263, 1999.

KEEFE, T. J.; HOLLAND, C. J.; SALYER, P. E.; RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 236-238, 1982.

KELCH, W. J. The canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia) epizootic in Vietnam and its implications for the veterinary care of military working dogs. **Military Medicine**, v. 149, p. 327-331, 1984.

KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C. K.; DAWSON, J. E.; ZASS, R.; BIGGIE, K. L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3-4, p. 331-340, 1996.

KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 6, p. 521-523, 2001.

KHO, W. G.; CHUNG, J. Y.; SIM, E. J.; KIM, M. Y.; Kim, D. W.; JONGWMIWES, S.; TANABE, K. A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Parasitology International**, v. 52, n. 3, p. 229-236, 2003.

KIKUTH, W. A new cause of anaemia, *Bartonella canis* nov. sp. **Klinische Wochenschrift**, v.7, p. 1729, 1928.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KJEMTRUP, A. M.; CONRAD, P. A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1323-1337, 2000.

KJEMTRUP, A. M.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A. J.; CUMMINGS, J.; BOUDREAUX, M. K.; STOCKHAM, S. L.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; CONRAD, P. A. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 14, p. 1501-1505, 2000a.

KJEMTRUP, A. M.; THOMFORD, J.; ROBINSON, T.; CONRAD, P. A. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. **Parasitology**, v. 120, n. 5, p. 487-493, 2000b.

KJEMTRUP, A. M.; WAINWRIGHT, K.; MILLER, M.; PENZHORN, B. L.; CARRENO, R. A. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 103-111, 2006.

KLAG, A. R.; DUNBAR, L. E.; GIRARD, C. A. Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 305-307, 1991.

KLEDMANEE, K.; SUWANPAKDEE, S.; KRAJANGWONG, S.; CHATSIRIWECH, J.; SUKSAI, P.; SUWANNACHAT, O.; SARIYA, L.; BUDDHIRONGAWATR, R.; CHAROONRUT, P.; CHAICHOUN, K. Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon canis* in Canine Blood. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 40, n. 1, p. 35-39, 2009.

KOCH, R. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten. Parasitäre Krankheiten Hygiene Haustiere*, v. 54, p. 1-9, 1906.

KÖHSLER, M.; LEITNER, B.; BLASCHITZ, M.; MICHEL, R.; ASPÖCK, H.; WALOCHNIK, J. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). ***Parasitology Research***, v. 98, n. 2, p. 86-93, 2006.

KONTOS, V. I.; PAPADOPOULOS, O.; DE, T. W. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. ***Veterinary Clinical Pathology***, v. 20, n. 4, p. 101-105, 1991.

KORDICK, S. K.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK, K. L.; COLITZ, C. M.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY, J. M.; RUMBOUGH, R.; McPHERSON, J. T. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, 1999.

KRAUSE, P. J.; TELFORD III, S.; SPIELMAN, A.; RYAN, R.; MAGERA, J.; RAJAN, T. V.; CHRISTIANSON, D.; ALBERGHINI, T. V.; BOW, L.; PERSING, D. Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 34, n. 11, p. 2791-2794, 1996.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. ***Briefings Bioinformatics***, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

KUTLER, K. L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (Ed.). ***Babesiosis of domestic animals and man***. CRC Press, Boca Raton, 1988. p. 1-22.

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

LABRUNA, M. B.; McBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. ***Veterinary Parasitology***, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

LAPPIN, M. R. Doenças infecciosas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. ***Medicina Interna de Pequenos Animais***. 3 ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2006. 1360pp.

LATREILLE, P. A. *Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in familias disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata*. Paris et Argentorati, v. 1, 302pp., 1806.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the piroplasms. **Transactions of American Microscopical Society**, v. 90, p. 2-33, 1971.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, III. J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. **A Newly Revised Classification of the Protozoa**. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LEVINE, N. D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. CRC Press, Florida: Boca Raton, 1988. V. II, p. 35-41.

LEW, A.; JORGENSEN, W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 292-302, 2005.

LEWIS, G.; RENQUIST, D.; HEMELT, I.; HUXSOLL, D.; RISTIC, M.; STEPHENSON, E. H. Experimental inoculation of *Macaca mulatta* with *Ehrlichia canis*-infected canine monocyte cell culture. In: ANNUAL MEETING OF CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASE, 56th, 1975, Chicago. **Anais...** Chicago, III, 1975. p. 15.

LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L.; LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; DE WAAL, D. T. Isolation of south African vector-specific strain of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 63, n. 1-2, p. 9-16, 1996.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 4, p. 418-431, 1998.

LUCIDI, C. A.; ANGERAMI, J. T. S.; RODRIGUES, R. R.; TAKAHIRA, R. K. Primeira ocorrência de *Babesia gibsoni* no estado de São Paulo: nota preliminar. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 231, 2004.

MACIEIRA, D. B. **Avaliação da ocorrência de *Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935) em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) com trombocitopenia na região metropolitana do Rio de Janeiro**. 2003. 92f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Clínica Veterinária, área de concentração: Clínica Veterinária), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2003.

MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M. F.; FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. O.; ALMONSY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MADEWELL, B. R.; GRIBBLE, D. H. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 5, p. 512-514, 1982.

MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R. C.; RISTIC, M.; COX, D.; MCDADE, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **The New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 14, p. 853-856, 1987.

MAHONEY, D. F. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J. P. **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1977. v. 4, p. 1-76.

MANGUIN, S.; KENGNE, P.; SONNIER, L.; HARBACH, R. E.; BAIMAI, V.; TRUNG, H. D.; COOSEMANS, M. SCAR markers and multiplex PCR based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. **Medical Veterinary Entomology**, v. 16, n. 1, p. 46-54, 2002.

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

MARSILIO, F.; MARTINO, B.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (*glT4*) gene from various italian strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 2, p. 215-217, 2006.

MARTIN, A. R.; BROWN, G. K.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 3, p. 176-80, 2005.

MARTINOD, S.; BROSSARD, M.; MOREAU, Y. Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. **Journal of Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 269-273, 1985.

MARTINOD, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 3-4, p. 245-54, 1986.

MATSUU, A.; KAWABE, A.; KOSHIDA, Y.; IKADAI, H.; OKANO, S.; HIGUSHI, S. Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 88, n. 8, p. 893-897, 2004.

MATSUU, A.; ONO, S.; IKADAI, H.; UCHIDE, T.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OKANO, S.; HIGUCHI, S. Development of a SYBR Green real-time PCR assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 2, p. 569-573, 2005.

MATTHEWMAN, L. A.; KELLY, P. J.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 65, n. 3, p. 104-107, 1994.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.

- McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441-447, 1996.
- MCCULLY, R. M.; BASSOON, P. A.; BIGALKE, R. D.; DE VOS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 117-133, 1976.
- McDADE, J. E. Ehrlichiosis - A disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.
- MEHLHORN, H.; RAETHER, W.; SCHEIN, E.; WEBER, M.; UPHOFF, M. Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Entwicklungszyklus and Einfluss von Pentamidin auf die Morphologie der intraerythrocytären Stadien von *Babesia microti*. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrifte**, v. 93, p. 400-405, 1986.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasms: a long story in short or “Robert Koch has seen it”. **European Journal of Protistology**, v. 29, p. 279-293, 1993.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 467-475, 1998.
- MEYER, D. Análise filogenética de seqüências de DNA. In: AMORIM, D. S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 1997. cap. 14, p. 187-208.
- 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.
- MORAIS, J. D.; DAWSON, J. E.; GREENE, C.; FILIPE, A. R.; GALHARDAS, L. C.; BACELLAR, F. First European case of ehrlichiosis. **The Lancet**, v. 338, n. 8767, p. 633-634, 1991.
- MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Estudo retrospectivo (1998-2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.2, p. 141-147, 2003.
- MOSQUERA, M. D.; ORY, F.; MORENO, M.; ECHEVARRIA, J. E. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 111-116, 2002.
- MUHLNICKEL, C. J.; JEFFERIES, U. M. R.; IRWIN, P. J. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, n. 10, p. 606-610, 2002.

MUNDIM, A. V.; MUNDIM, M. J. S.; JENSEN, N. M. P.; ARAÚJO, S. F.; *Hepatozoon canis*: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v. 10, p. 89-95, 1994.

MURATA, T.; SHIRAMIZU, K.; HARA, Y.; INOUE, M.; SHIMODA, K.; NAKAMA, S. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 53, n. 6, p. 1097-1099, 1991.

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. F.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p.197-204. 2003.

NAKAGHI, A. C. H.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D.; ANDRADE, G. M. Estudo comparativo entre a PCR baseada no gene *dsb* e a nested PCR no diagnóstico da erliquiose canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES, 13º, 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004.

NAZARENKO, I.; BHATNAGAR, S.; HOHMAN, R. A. closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 12, p. 2516-2521, 1997.

NEER, T. M. Ehrlichiosis: canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. cap. 28, p. 139-154.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. **Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM**. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 309-315, 2002.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333p.

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.

NOBREGA, M. P.; GUEDES, R. F. Análise do Fragmento Genômico F10 de *Paracoccidioides brasiliensis*. **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós Graduação**, 01, 2005. ISBN: Português, Meio digital. <http://biblioteca.univap.br:88/inic/>.

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

O'DWYER, L. H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C. L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, p. 83-84, 1997.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2002. p. 57-67.

O'DWYER, L. H.; LOPES, V. V.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 23-26, 2009.

OGUNKOYA, A. B.; ADYANJU, J. B.; ALIU, Y. O. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, n. 12, p. 775-777, 1981.

OLIVEIRA, M. R., KREIER, J. P. Transmission of *Babesia microti* using various species of ticks as vectors. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 816-817, 1979.

OLMEDA, A. S.; ARMSTRONG, P. M.; ROSENTHAL, B. M.; VALLADARES, B.; CASTILLO, A.; ARMAS, F.; MIGUELEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; RODRÍGUEZ, J. A. R.; SPIELMAN, A.; TELFORD, S. R. A subtropical case of human babesiosis. **Acta Tropica**, v. 67, n. 3, p. 229-234, 1997.

OTSUKA, H. Studies on transmission of *Babesia gibsoni* Patton by *Haemaphysalis longicornis* Neumann. **Bulletin of the Faculty of Agriculture, University of Miyazaki**. 1901, v.21, p. 359-367, 1974.

OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1343-1346, 2005.

PADLEY, D.; MOODY, A. H.; CHIODINI, P. L.; SALDANHA, J. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 131-137, 2003.

PAROLA, P.; CORNET, JEAN-PAUL; SANOGO, Y. O.; MILLER, R. S.; THIEN, H. V.; GONZALEZ, JEAN-PAUL; RAOULT, D.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1600-1608, 2003.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de biologia molecular. ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Eds.). In: **Biologia molecular básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. cap. 16, p. 403-406.

- PASSOS, L. M.; BELL-SAKYI, L.; BROWN, C. G. Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 239-249, 1998.
- PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.
- PATEL, R. G.; BYRD, M. A. Near fatal acute respiratory distress syndrome in a patient with human ehrlichiosis. **South Medical Journal**, v. 92, n. 3, p. 333-335, 1999.
- PATTON, W. S. Rapport préliminaire sur un nouveau piroplame, *P. gibsoni nov. sp.* Trouvé dans le sang du chien de madras et du chacal *Canis aureus*. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 3, p. 274-280, 1910.
- PELANDAKIS, M.; PERNIN, P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2061-2065, 2002.
- PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis* - like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.
- PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia canis* detection in symptomatic humans in Venezuela. **Proceedings of the Fourth International Conference Rickettsiae and Rickettsial Diseases**, Spain, 2005. Logrono, p. 45, 2005.
- PERSING, D. H.; MATHIESEN, D.; MARSHALL, W. F.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A.; THOMFORD, J. W.; CONRAD, P. A. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reacton. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2097-2103, 1992.
- PETERSEN, L. R. ; SAWYER, L. A.; FISHBEIN, D. B.; KELLEY, P. W.; THOMAS, R. J.; MAGNARELLI, L. A.; REDUS, M.; DAWSON, J. E. An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserve unit exposed to ticks. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 3, p. 562-568, 1989.
- 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1556-1559, 1997.
- PIANA, G. P.; GALLI-VALERIO, B. Su di un'infezione del cane con parassiti endoglobulari nel sangue. Nota preventiva. **Il Moderno Zoiatria**, v. 6, p. 163-169, 1895.
- PINYOOWONG, D.; JITTAPALAPONG, S.; SUKSAWAT, F.; STICH, R. W.; THAMCHAIPENET, A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 4, p. 433-438, 2008.

PRICE, J. E.; DOLAN, T. T. A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. **Veterinary Record**, v. 107, n. 12, p. 275-277, 1980.

PUSTERLA, N.; HUDER, J.; WOLFENBERGER, C.; LITSCHI, B.; PARVIS, A.; LUTZ, H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2307-2309, 1997.

REGENDANZ, P.; MUNIZ, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 1, p. 81-84, 1936.

REICHENOW, E. Uebertragungsweise and entwicklung der piroplasmen. **Zentralblatt für Bakteriologie 1 Abt Originale B, Hygiene, Krankenhaushygiene, Betriebshygiene, präventive Medizin**, v. 135, p. 108-119, 1935.

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.

REITER, I.; WEILAND, G. Recently developed methods for the detection of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83 (suppl.), p.21-23, 1989.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. Frequência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 6, p. 511-517, 1990.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

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

RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffensis*, *E. canis* or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2107-2112, 1994.

RIPOLI, C. M.; REMONDEGUI, C. E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M. J.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; OLSON, J. G.; SANTOS-BUCH, C. A. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 350-354, 1999.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; WEISIGER, R. M.; HILDENBRANDT, P. K.; NYNDO, M. B. A. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1972.

- RISTIC, M; HUXSOLL, D. L. Tribe II Ehlichiae (Philip, 1957). In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Gram-negative bacteria of general, medical, or industrial importance**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. cap. 9, v. 1, p. 704-709.
- RUBINI, A. S.; PADUAN, G. G. C.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v. 97, n. 2, p. 91-93, 2005.
- RUDZINSKA, M., SPIELMAN, A., LEWENGRUB, S., PIESMAN, J., KARAKASHIAN, S. The sequence of developmental events of *Babesia microti* in the gut of *Ixodes dammini*. **Protistologica**, v. 20, p. 649-663, 1984.
- RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 12, p. 130-136.
- SÁ, A. G.; CERQUEIRA, A. M. F.; O'DWYER, L. H.; MACIEIRA, D. B.; ABREU, F. S.; FERREIRA, R. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* form naturally infected Brazilian dogs. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 163-168, 2006.
- SAHIBI, H.; RHALEM, A.; BERRAG, B.; GOFF, W. L. Bovine babesiosis. Seroprevalence and ticks associated with cattle from two different regions of Morocco. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, p. 213-218, 1998.
- SAINZ, A. **Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb**. 1996. 255f. Tese (Doutorado), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 1996.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Appendix B: Preparation of Reagents and Buffers Used in Molecular Cloning. In: **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Book 3, p. B.24.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Rapid isolation of mammalian DNA. In: **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 6.28-6.29.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTARÉM, V. A.; LAPOSY, C. B.; FARIAS, M. R. Inclusões Plaquetárias Semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em Gato. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 2, p. 60-66, 2005.

- SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2007.
- SCHEIN, E., REHBEIN, G., VOIGT, W. P., ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran, 1901). 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmedizin Und Parasitologie**, v. 32, p. 223–237, 1981.
- SCHETTERS, T.; KLEUSKENS, N.; SCHOLTES, N.; BOS, H. J. Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 215-218, 1995.
- SCHETTERS, T. P.; MOUBRI, K.; PRECIGOUT, E.; KLEUSKENS, J.; SCHOLTES, N. C.; GORENFLOT, A. Different *Babesia canis* isolates, different diseases. **Parasitology**, v. 115, n. 5, p. 485-493, 1997.
- SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A.; MILLS, A. G.; GORN, V.; SINGER, M. J.; REED, M. W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Analytical Biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 194-204, 2000.
- SCHOOLS, L. M. et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2215-2222, 1999.
- SEXTON, D. J.; COREY, G. R.; CARPENTER, C.; KONG, L. Q.; GANDHI, T.; BREITSCHWERDT, E.; HEGARTY, B.; CHEN, S-M.; FENG, H-M.; YU, X-J. ; OLANO, J.; WALKER, D. H.; DUMLER, S. J. Dual infection with *Ehrlichia chaffeensis* and a spotted fever group rickettsia: a case report. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 311-316, 1998.
- SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **TRENDS in Parasitology**, v.17, n. 2, p. 74-80, 2001.
- SHORTT, H. E. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n. 2, p. 119-148, 1973.
- SHORTT, H. E. Life-History and morphology of *Babesia canis* in the dog- tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 23, p. 885-920, 1936.
- SIGRIST, B. Übertragung von *Babesia equi* durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus*. **Inaug. Diss.**, Hannover 59, 1983.
- SIMPSON, R. M.; GAUNT, S. D.; HAIR, J. A.; KOCAN, K. M.; HENK, W. G.; CASEY, H. W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 9, p. 1537-1541, 1991.

- SIRIGIREDDY, K. R.; GANTA, R. R. Multiplex Detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* Species Pathogens in Peripheral Blood by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 2, p. 308-316, 2005.
- SIRIGIREDDY, K. R.; MOCK, D. C.; GANTA, R. R. Multiplex Detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* Pathogens in Vertebrate and Tick Hosts by Real-Time RT-PCR. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 552–556, 2006.
- SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, Causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.
- SOULSBY, E. J. L. **Helminths, Arthropods & Protozoa of Domesticated Animals**. 6 ed. London: The Willians & Wilkins Company, Baltimore, 1968. 824p.
- SOUSA, M. G.; HIGA, A. C.; GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, n.2, p. 126-130, 2004.
- STANNARD, A. A.; GRIBBLE, D. H.; SMITH, R. S. Equine ehrlichiosis, a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. **Veterinary Record**, v. 84, n. 6, p. 149-150, 1969.
- STARCOVICI, C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Hamoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenk. Abt. I.**, v. 14, p. 1-8, 1893.
- 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.
- STOCKHAM, S. L.; SCHMIDT, D. A.; CURTIS, K. S.; SCHAUF, B. G.; TYLER, J. W.; SIMPSON, S. T. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 1, p. 63-68, 1992.
- SUKSAWAT, J.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 1, p. 50-55, 2000.
- SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C. Coinfection with Three *Ehrlichia* Species in Dogs from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA Secondary Structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 90–93, 2001.

SWAMINATH, C. The arthropod vector of *Babesia gibsoni*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 25, p. 499–503, 1937.

SWANGO, L. J.; BANKEMPER, K. W.; KONG, L. I. Infecções bacterianas, riquetsiais, protozoais, e outras. In: Ettinger, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. 4v, v. 1. cap. 46, p. 290-293.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. **Tick Transmitted Diseases**, v. 21, n. 1, p. 103-123, 1991.

TABOADA, J.; HARVEY, J. W.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Seroprevalence of babesiosis in Grey-hounds in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 1, p. 47-50, 1992.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Infecções por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p. 563-565.

TABOADA, J. Babesiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998. p. 473-481.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S. M.; FOLEY, J. Ticks and tickborne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 119-127, 2005.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position, specific gap penalties, and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORRES, H. M.; MASSARD, C. L.; FIGUEIREDO, M. J.; ALMOSNY, N. R. P.; FERREIRA, T. Isolamento e propagação de *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 77-82, 2002.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006a.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 177-180, 2006b.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine Ehrlichiosis: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Ehrlichia risticii* infections. In: GREENE C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990. cap. 37, p. 404-414.

TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-308, 1996.

UILENBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne diseases of domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 72, n. 4, p. 485-491, 1986.

UILENBERG, G.; FRANSSSEN, F. F. J.; PERIÉ, N. M.; SPANJER, A. A. M. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, v. 11, n. 1, p. 33-40, 1989.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

ULLMANN, A. J.; GABITZSCH, E. S.; SCHULZE, T. L.; ZEIDNER, N. S.; PIESMAN, J. Three Multiplex Assays for Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* sensu lato in Field-Collected Ixodes Nymphs in North America. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 1057-1062, 2005.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2788–2793, 2001.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16S rRNA Gene Sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* Species from Canine Blood in Japan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 692–698, 2003.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 306p.

VERCAMMEN, F.; DEKEN, R.; MAES, L. Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using the IFAT. **Parasite**, v. 2, n. 4, p. 407-410, 1995.

VIDOTTO, O.; TRAPP, S. M. Babesiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 58-61, 2004.

VINASCO, J.; LI, O.; ALVARADO, A.; DIAZ, D.; HOYOS, L.; TABACHI, L.; SIRIGIREDDY, K.; FERGUSON, C.; MORO, M. H. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2716-2719, 2007.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBER Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, v. 276, n. 1, p. 59-64, 1999.

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.
- WEAVER, R. A. G.; VIRELLA, G.; WEAVER, A. M. Y. Ehrlichiosis with severe pulmonary manifestations despite early treatment. **Southern Medical Journal**, v. 92, n. 3, p.336-339, 1999.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; 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**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.
- WENYON, C. M. Protozoology. In: **A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists**, v. II, New York: Hafner Publish. Co., 1926. p. 986.
- WILHELM, J.; PINGOUD, A.; HAHN, M. Comparison between Taq DNA polymerase and its Stoffel fragment for quantitative real-time PCR with hybridization probes. **Biotechniques**, v. 30, n. 5, p. 1052-1062, 2001.
- WILSON, J. F. *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 28, n. 4, p. 381-383, 1992.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.
- 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.
- YAMANE, I.; CONRAD, P. A.; GARDNER, I. A. *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Journal of Protozoology Research**, v. 3, p. 111-125, 1993a.
- YAMANE, I.; THOMFORD, J. W., GARDNER, I. A.; DUBEY, J. P.; LEVY, M.; CONRAD, P. A. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1579-1584, 1993b.
- YAMANE, I.; GARDNER, I. A.; RYAN, C. P.; LEVY, M.; URRICO, J.; CONRAD, P. A. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 18, n. 4, p. 293-304, 1994.

YABSLEY, M. J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON, C. N.; CATTAN, P. F.; CHERRY, N. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B.; O'CONNOR, T.; CHANDRASHEKAR, R.; PATERSON, T. ; PEREA, M. L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J.; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 279–285, 2008.

YIN, J. L.; SHACKEL, N. A.; ZEKRY, A.; McGUINNESS, P. H; RICHARDS, C.; PUTTEN, K. V. D.; McCAUGHAN, G. W.; ERIS, J. M.; BISHOP, G. A. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. **Immunology and Cellular Biology**, v. 79, n. 3, p. 213-221, 2001.

ZAHLER, M.; SCHEIN, E.; RINDER, H.; GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, v. 84, n. 7, p. 544-548, 1998.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 241-248. 2000.

5 ANEXOS

Página

Anexo A - Protocolo de Extração de DNA.

Anexo B - Quantificações de DNA.

Anexo C - Quantificações das Purificações.

Anexo A - Protocolo de Extração de DNA:

- 1- Descongelar e homogeneizar as amostras de sangue;
- 2- Em um tubo de microcentrifuga de 2mL colocar 350µL de sangue total com EDTA, adicionar 50µL de Proteinase K (20mg/mL, Invitrogen[®]) e incubar a 65°C em banho-maria por 15 minutos;
- 3- Acrescentar 500µL de Dodecil Sufato de Sódio 10 % (SDS), homogeneizar por inversão e incubar novamente a 65°C por 6 minutos;
- 4- Adicionar 800µL de clorofórmio e homogeneizar vigorosamente em *vortex*;
- 5- Adicionar 400µL de solução de precipitação protéica (11 % de ácido acético e 5M de acetato de potássio) e homogeneizar em *vortex* novamente;
- 6- Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos e pipetar a fase sobrenadante para outro tubo de microcentrifuga (1,5mL);
- 7- Adicionar etanol absoluto (100 %) em temperatura gelado e homogeneizar por inversão, esperando entre 30 e 60 segundos para precipitar o DNA;
- 8- Realizar nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;
- 9- Adicionar 1mL de etanol 70 % em temperatura gelado, centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos e desprezar novamente o sobrenadante;
- 10- Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto e remover os resíduos de etanol com o auxílio de uma pipeta;
- 11- Inverter os tubos e deixar secar em estufa à 37°C;
- 12- Após a secagem, eluir o pellet de DNA em 50 a 100µL de água ultrapura ou TE;
- 13- Incubar em banho-maria a 65°C por 5 minutos;
- 14- O DNA extraído deve ser mantido em freezer a -20°C.

Fonte: Sambrook e Russel (2001), com modificações.

Anexo B - Quantificações de DNA total do sangue de cães:

Quantificações de DNA total						
Amostra	Concentração (ng/µl)	Absorbâncias		A260/A280	A260/A320	Constante
		A260	A280			
1E	10,90	0,218	0,145	1,5	0,94	50
2E	39,20	0,783	0,464	1,7	0,69	50
3E	11,00	0,221	0,136	1,6	0,41	50
4E	171,70	3,435	1,967	1,8	1,10	50
5E	23,80	0,476	0,340	1,4	0,44	50
6E	7,20	0,45	0,440	1,7	1,01	50
7E	25,50	0,510	0,310	1,7	0,77	50
8E	246,30	4,926	3,497	1,4	1,15	50
9E	39,40	0,789	0,547	1,7	0,95	50
10E	23,20	0,465	0,275	1,7	0,95	50
11E	292,80	5,857	3,156	1,9	1,89	50
12E	323,20	6,465	3,542	1,8	2,06	50
13E	9,20	0,183	0,103	1,8	0,39	50
14E	194,40	3,887	2,141	1,8	1,70	50
15E	300,90	6,019	3,283	1,8	2,03	50
16E	24,00	0,481	0,308	1,6	1,05	50
17E	258,10	5,162	3,152	1,6	0,84	50
18E	169,20	3,384	2,126	1,6	0,92	50
19E	35,80	0,716	0,392	1,8	1,78	50
20E	485,50	9,710	5,336	1,8	2,12	50
21E	100,22	2,004	1,208	1,7	1,28	50
22E	146,77	2,935	1,586	1,9	1,33	50
23E	108,46	2,169	1,177	1,8	1,21	50
24E	233,60	4,672	2,562	1,8	1,39	50
25E	95,12	1,902	1,097	1,7	1,41	50
26E	90,43	1,809	1,046	1,7	0,98	50
27E	19,48	0,39	0,297	1,3	0,44	50
28E	61,32	1,226	0,675	1,8	1,19	50
29E	18,78	0,376	0,22	1,7	0,45	50
30E	8,78	0,176	0,142	1,2	0,30	50
31E	57,97	1,159	0,626	1,9	1,42	50
32E	58,47	1,169	0,612	1,9	1,04	50
33E	79,38	1,588	0,97	1,6	0,84	50
34E	65,58	1,312	0,8	1,6	0,63	50
35E	26,62	0,532	0,313	1,7	0,70	50
36E	34,54	0,691	0,385	1,8	0,79	50
37E	52,72	1,054	0,565	1,9	1,09	50
38E	21,75	0,435	0,317	1,4	0,39	50
39E	27,58	0,552	0,372	1,5	0,46	50
40E	12,83	0,257	0,197	1,3	0,33	50

Quantificações de DNA total						
Amostra	Concentração (ng/µl)	Absorbâncias		A260/A280	A260/A320	Constante
		A260	A280			
1B	62,6	1,251	0,699	1,8	0,98	50
2B	17,9	0,357	0,196	1,8	0,57	50
3B	47,9	0,958	0,589	1,6	0,56	50
4B	55,3	1,105	0,651	1,7	1,03	50
5B	37	0,741	0,432	1,7	0,7	50
6B	40,8	0,816	0,521	1,6	0,73	50
7B	26,7	0,534	0,342	1,6	0,89	50
8B	73,3	1,465	0,872	1,7	1,01	50
9B	50,7	1,014	0,621	1,6	0,6	50
10B	107,7	2,155	1,276	1,7	0,96	50
11B	40,5	0,81	0,483	1,7	0,76	50
12B	82,6	1,653	0,923	1,8	1,17	50
13B	24,1	0,482	0,326	1,5	0,53	50
14B	766	15,32	10,147	1,5	0,98	50
15B	111,8	2,236	1,474	1,5	0,74	50
16B	86,1	1,722	0,983	1,8	1,27	50
17B	52,8	1,055	0,63	1,7	0,89	50
18B	39,7	0,794	0,529	1,5	0,54	50
19B	198,8	3,977	2,322	1,7	1,18	50
20B	15,4	0,308	0,173	1,8	0,35	50
21B	199,6	3,992	2,205	1,8	1,45	50
22B	92,2	1,843	0,98	1,9	1,16	50
23B	13,6	0,271	0,184	1,5	0,31	50
24B	86,1	1,722	1,09	1,6	0,44	50
25B	76,9	1,539	1,077	1,4	0,5	50
26B	24,1	0,482	0,266	1,8	0,43	50
27B	30	0,6	0,294	2,0	0,78	50
28B	16,6	0,33	0,151	2,2	0,63	50
29B	18,1	0,361	0,216	1,7	0,45	50
30B	113,2	2,263	1,258	1,8	1,21	50
31B	111	2,22	1,112	2	1,62	50
32B	28,4	0,568	0,389	1,5	0,29	50
33B	87	1,739	0,954	1,8	0,91	50
34B	16,5	0,33	0,172	1,9	0,33	50
35B	58,8	1,176	0,763	1,5	0,54	50
36B	27,8	0,556	0,216	2,6	0,75	50
37B	128,36	0,026	0,011	2,4	100	50
M1	80,6	1,611	0,918	1,8	0,57	50
M2	66,2	1,324	0,778	1,7	0,84	50

Quantificações de DNA total						
Amostra	Concentração (ng/µl)	Absorbâncias		A260/A280	Fator de diluição	Constante
		A260	A280			
1N	211,97	0,042	0,021	2,0	100	50
2N	80,11	0,016	0,007	2,3	100	50
3N	64,96	0,013	-0,006	-2,2	100	50
4N	117,26	0,023	0,017	1,4	100	50
5N	13,28	0,003	0,006	0,5	100	50
6N	36,66	0,007	0,004	1,8	100	50
7N	71,07	0,014	0,013	1,1	100	50
8N	76,46	0,015	0,014	1,1	100	50
9N	136,29	0,027	0,012	2,3	100	50
10N	56,74	0,011	0,003	3,7	100	50
11N	85,30	0,017	0,07	2,4	100	50
12N	156,03	0,031	0,010	3,1	100	50
13N	87,19	0,017	0,010	1,7	100	50
14N	51,66	0,010	0,010	1,0	100	50
15N	38,33	0,008	0,004	2,0	100	50
16N	46,83	0,009	0,016	0,6	100	50
17N	109,86	0,022	0,009	2,4	100	50
18N	51,42	0,010	0,009	1,1	100	50
19N	234,35	0,047	0,024	2,0	100	50
20N	23,67	0,005	0,005	1,0	100	50
21N	32,84	0,007	0,001	7,0	100	50
22N	85,79	0,017	0,013	1,3	100	50
23N	304,91	0,061	0,036	1,7	100	50
24N	187,35	0,037	0,022	1,7	100	50
25N	65,81	0,013	0,008	1,6	100	50
26N	145,84	0,029	0,015	1,9	100	50
27N	42,24	0,008	0,009	0,9	100	50
28N	12,78	0,003	0,006	0,5	100	50
29N	77,29	0,015	0,006	2,5	100	50
30N	85,73	0,017	0,011	1,6	100	50
31N	52,25	0,010	0,005	2,0	100	50
32N	79,88	0,016	0,008	2,0	100	50
33N	117,00	0,023	0,021	1,1	100	50
34N	17,38	0,003	0,001	3,0	100	50
35N	77,76	0,016	0,007	2,3	100	50
36N	103,25	0,021	0,016	1,3	100	50
37N	92,66	0,019	0,014	1,4	100	50
38N	126,58	0,025	0,008	3,1	100	50
39N	121,02	0,024	0,011	2,2	100	50
40N	148,29	0,030	0,018	1,7	100	50

Quantificações de DNA total						
Amostra	Concentração (ng/μl)	Absorbâncias		A260/A280	Fator de diluição	Constante
		A260	A280			
Controle <i>Babesia canis</i>	100	0,020	0,017	1,2	100	50
Controle <i>Ehrlichia canis</i>	120	0,024	0,019	1,3	100	50

Anexo C - Quantificações das Purificações:

Quantificações das purificações						
Amostra	Concentração (ng/μl)	A260	A280	A260/A280	A260/A320	Constante
1B	31,69	0,634	0,371	1,71	0,9	50
2B	27,42	0,548	0,295	1,86	0,89	50
3B	NR					
4B	NR					
9B	9,31	0,186	0,177	1,59	0,78	50
12B	30,91	0,618	0,395	1,57	0,51	50
10B	NR					
16B	NR					
33B inesp	NR					
M1	93,5			1,70		50
M2	58,5			1,76		50
11E	46,3			1,67		
19E	39,1			1,66		50
20E	32,7			1,65		50
M2	16,4			1,83		50