

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOPARASITAS E
FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma
gondii* E ANTI-*Neospora caninum*, EM GATOS
PERIDOMICILIADOS NA CIDADE DE SÃO LUÍS,
MARANHÃO.**

Maria do Socorro Costa Oliveira Braga

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOPARASITAS E
FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* E
ANTI-*Neospora caninum*, EM GATOS PERIDOMICILIADOS
NA CIDADE DE SÃO LUÍS, MARANHÃO.**

Maria do Socorro Costa Oliveira Braga

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2010

B813 Braga, Maria do Socorro Costa Oliveira
e DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOPARASITAS E
FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* E ANTI-
Neospora caninum, EM GATOS PERIDOMICILIADOS NA CIDADE
DE SÃO LUÍS, MARANHÃO. Maria do Socorro Costa Oliveira Braga.
Jaboticabal, 2010
x, 90 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Rosangela Zacarias Machado
Banca examinadora: Antônio Raimundo Lima Cruz Teixeira,
Andrea Higa, Aureo Evangelista Santana, Mirela Tinucci Costa.
Bibliografia

1. Felinos- *Mycoplasma* sp. 2. Felinos- *Neosporose caninum*. 3.
Felinos – *Toxoplasma gondii*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 616: 636.8

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Maria do Socorro Costa Oliveira Braga – casada, nascida na cidade de Água-Doce, Maranhão, em 30 de outubro de 1961. É médica veterinária formada pela Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, São Luís do Maranhão, em 1986. Concluiu o mestrado em 1999, na Universidade de Brasília-UNB, Brasília, área de concentração Patologia Molecular. Atualmente é professora do Curso de Medicina Veterinária, onde ministra as disciplinas Imunologia Veterinária e Biologia Celular e Molecular; exerceu os cargos de chefe do Departamento de Clínicas-Veterinárias e do Laboratório de Virologia II (Raiva). Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, pelo Programa de Doutorado Interinstitucional (DINTER) entre a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal UNESP - SP e o Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, em outubro de 2007, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado.

Dedico

À minha mãezinha
Rozeira, pelo amor,
carinho, ensinamentos,
dedicação e pela formação
que me proporcionou.

À minha filha do coração
Adriana, pelo carinho e
dedicação a mim e aos
meus filhos.

Aos meus filhos Diego,
Luana e Luenna, pelo
apoio, pelo amor
incondicional que nos une
e pela paciência de me
esperar.

Aos meus irmãos
Agamenon, Pádua, Florize
e Conceição, pela
confiança que sempre
depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, pela competência, segurança e pela firmeza que sempre demonstrou como orientadora e por ter dado a mim as condições para que eu continuasse a ver novos horizontes em minha vida e no mundo científico.

Ao Prof. Dr. Antônio Raimundo Lima Cruz Teixeira, por ter-me proporcionado e iluminado o caminho que me conduziu para mundo da pesquisa

À Profa. Dra. **Francisca Neide Costa**, pela implantação do DINTER entre a UNESP e a UEMA e por sua incansável luta à frente da coordenação.

À professora Ana Clara, pelo apoio e pela correção do texto oriundo da pesquisa.

A todos os professores do DINTER, pela contribuição que deram para o meu crescimento profissional

À minha avó Luzia, por ter-me aceitado, pelo carinho e cuidado como mãe nos momentos difíceis.

À Dona Vicença, minha segunda mãe, pelo cuidado e amor que tem por mim.

Às minhas amigas, Temis, Isabel, Bethy, Soninha, Marilda, Dilma, Maria Santa, Efigênia, Laurinete, Amélia, Meire, Paula, e irmã Jaciara, pela amizade, apoio e orações que fazem por mim: às minhas cunhadas Arleide e Glória, pelo apoio mesmo de longe.

À profa. Dra. Adolorata Bianco, pelo atenção e carinho a mim dedicado.

Ao professor Rego da Universidade Estadual do Maranhão, pelo apoio e colheita das amostras e à Ruthe pela amizade e apoio.

Ao meu ex-professor e meu melhor amigo Paulo Vasconcelos, pelo apoio durante a pesquisa em São Luís e pela grande amizade que nos une.

À aluna de graduação em veterinária e minha ex-orientada de iniciação científica, Daniela Rosa Xavier, por sua dedicação e colaboração durante a etapa experimental deste trabalho, tanto no campo quanto no laboratório.

Àos meus alunos de graduação do primeiro período e terceiro período de 2008, pelo apoio durante as colheitas e aos técnicos Mário, Evangelista, Carlos, Lurdes, Bethy, Valda e Lauro Queiroz pelo apoio e amizade.

Às minhas alunas Mayra e Tatiane, que hoje são minhas colegas de profissão, por estarem aqui junto comigo fazendo pós-graduação e me dando força.

Ao Osni, meu ex-aluno, que sempre esteve comigo durante as colheitas das amostras.

À minha amiga Márcia Teixeira, o meu especial agradecimento pela contribuição nos experimentos desta pesquisa, pela amizade, pelo apoio e pela força que me proporcionou neste trabalho, sendo o meu esteio nesta pesquisa e na minha estada aqui em Jaboticabal.

Ao Marcos André, por todos os momentos que estivemos juntos na condução dos experimentos.

À Carla, pela contribuição nos experimentos e a todos os colegas do laboratório, pelo carinho e amizade.

À Rafaela Beraldo, pelo apoio tolerância e amizade.

Aos meus colegas de turma do DINTER, pelo convívio e solidariedade durante o decorrer do curso.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, especialmente **Mabel**, pela amizade e carinho.

À bibliotecária, **Tiéko Takamiya Sugahara**, pelo carinho e amizade pela correção das referências.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia que concordaram com o meu afastamento para eu vivenciar mais uma etapa importante da minha vida.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro e à Universidade Estadual do Maranhão-UEMA.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Erliquioses em felinos domésticos	3
2.1.1 Agentes etiológicos	3
2.1.2 Transmissão e Ciclo Biológico da <i>Ehrlichia canis</i>	4
2.1.3 Detecção direta por meio de esfregaços sanguíneos	5
2.1.4 Sinais clínico laboratoriais e achados de necropsia	6
2.1.5 Diagnóstico Sorológico.....	7
2.1.6 Diagnóstico Molecular	9
2.2 Babesiose em felinos domésticos	10
2.3 Toxoplasmose e Neosporose em felinos domésticos.....	12
2.4 Micoplasmose em felinos domésticos	16
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Descrição da localidade do experimento	21
4.2 Grupo experimental	22
4.2.1 Características dos animais.....	22
4.3 Colheita das amostras	22
4.4 Esfregaços sanguíneos	23

4.5 Sorologia	23
4.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i>	23
4.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia canis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	24
4.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	26
4.6.1 Extração de DNA de Sangue total	26
4.6.2 Amplificação do DNA do gênero <i>Ehrlichia</i> (Identificação Molecular da <i>Ehrlichia</i>)	27
4.6.2.1 Amplificação do DNA da espécie <i>Ehrlichia canis</i> (Nested PCR)	27
4.6.2.2 Amplificação do DNA da espécie <i>Ehrlichia chaffeensis</i> (Nested PCR)	28
4.6.2.3 Reação de Amplificação do tipo Nested PCR para <i>Ehrlichia</i> sp. baseada no gene omp-1	29
4.6.2.4 Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. baseada no gene dsb	29
4.6.2.5 Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. baseada no gene GroESL	30
4.6.2.6 Reação de Amplificação para <i>Ehrlichia</i> sp. de acordo com o gene citrato sintase (gltA)	31
4.6.3 Reação de Amplificação para <i>Babesia canis</i> e <i>Cytauxzoon</i> sp. baseada no gene 18S RDNA	32

4.6.4	Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma haemofelis</i> e ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ baseada no gene 16S rRNA	33
4.6.4.1	Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma haemofelis</i> baseada no gene 16S rRNA	33
4.6.4.2	Reação de Amplificação para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ baseada no gene 16S rRNA	34
4.6.4.3	Reação de Amplificação para <i>Mycoplasma turicensis</i> baseada no gene 16S rRNA	35
4.7	Eletroforese de DNA em gel de Agarose	35
4.8	Reações de sequenciamento.....	36
4.8.1	Extração dos amplicómeros do gel de agarose	36
4.8.2	Quantificação de DNA dos amplicómeros	36
4.9	Reação de Sequenciamento.....	37
4.10	Análise dos Resultados.....	38
4.10.1	Análise dos produtos seqüenciados.....	38
5.	RESULTADOS	40
5.1	Sinais clínicos e esfregaços sanguíneos	40
5.2	Sorologia	40
5.2.1	Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI).....	40
5.2.1.1	Soropositividade para <i>Ehrlichia canis</i>	40

5.2.1.2 Soropositividade para <i>Babesia canis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	41
5.2.1.3. Co-reatividade para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia canis</i> .	43
5.2.1.4. Co-soropositividade e co-soronegatividade para <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>	44
5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
5.3.1 PCR para <i>E. canis</i> e <i>E. chaffeensis</i>	44
5.3.2 PCR para o gênero <i>Ehrlichia</i> sp. baseada nos genes Omp-1, dsb, GroESL e citrato-sintase.....	46
5.3.3 PCR para <i>Cytauxzoon</i>	46
5.3.4 PCR para <i>Mycoplasma</i> sp.....	46
5.4 Análise das similaridades de sequências pelo BLAST e Mega.....	49
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS	63

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA 1. Co-soropositividade e co-soronegatividade de soros de felídeos amostrados frente aos antígenos de <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i>	43
TABELA 2. Co-soropositividade e co-sonegatividade de soros amostrados frente aos antígenos de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	44
TABELA 3. Distribuição numérica de produtos da PCR positivos (n=29) por espécie dentro do gênero <i>Mycoplasma spp.</i> em gatos domésticos (n=200) de São Luís –MA	47
TABELA 4. Comparação da Homologia entre as sequências dos amplicómeros obtidos na PCR com os oligos ECAN/HE3 de fragmento do gene 16S rRNA para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Ehrlichia chaffeensis</i> (Família Anaplasmataceae) com amostras publicadas no GenBank. Com o valor da porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST (eValue=0).....	49
TABELA 5. Comparação da homologia entre sequências dos amplicómeros obtidos na PCR com os oligos 1183F e 1290R; Hfelis-fl e Hfelis-r3 e Cali-F e Cali-R de ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ', ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' e <i>Mycoplasma haemofelis</i> , respectivamente, com amostras depositadas no GenBank e respectivos valores percentuais de identidade.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1. Mapa da cidade de São Luís-MA mostrando os 4 municípios e a localização da cidade. Fonte: Google imagens, acesso 08 de janeiro de 2010	21
FIGURA 2. Frequência de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> em soros de gatos (n=200), colhidos na cidade de São Luís-MA, no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.....	41
FIGURA 3. Frequência de anticorpos anti- <i>Babesia canis</i> em soros de gatos (n=200) colhidos na cidade de São Luís-MA no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.....	42
FIGURA 4. Frequência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em soros de gatos (n=200) colhidos na cidade de São Luís-MA no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.....	42
FIGURA 5. Frequência de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em soros de gatos (n=200) colhidos na cidade de São Luís-MA no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.....	43
FIGURA 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>E. canis</i> de acordo com a sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaleta 2: amostra de gato doméstico negativa (211); Canaleta 3: amostra de gato doméstico positiva (n° 45) para <i>E. canis</i> pela <i>Nested PCR</i> HE-3/ ECAN - 5	45
FIGURA 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para <i>E. chaffeensis</i> de acordo com sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle negativo (água pura estéril); Canaleta 2: controle positivo; Canaletas 3 e 4: amostras (n° 211) de gato doméstico positiva para <i>E. chaffeensis</i>	

pela *Nested* PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores CHAFF/GAIUR.....45

FIGURA 8. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros de 500 pb mostrados na foto são relativos à PCR para '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' baseado na sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle negativo Canaleta 2, 3, 4 e 5: amostras de gatos domésticos positivas; Canaleta 6: controle positivo47

FIGURA 9. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros 200 pb mostrados na foto são relativos à PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' baseado na sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 25 e 26 amostras de gatos domésticos positivas; Canaleta 27: controle positivo; Canaleta: 28 controle negativo.....48

FIGURA 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros 400pb mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma haemofelis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 7, 12, 14, 15 e 16: amostras positivas de gatos domésticos na nPCR para o gene 16S rRNA; Canaleta 17 controle negativo.....48

FIGURA 11. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para a família Anaplasmataceae: gênero e espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* obtidas com sequências parciais do gene 16S rRNA (5' – 3') de sangue de gatos domésticos naturalmente infectados na cidade de São Luís - Maranhão, Brasil. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com Bootstrap" de 1.000 repetições.....51

FIGURA 12. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para a ordem R gênero e espécies '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e *Mycoplasma haemofelis*, obtidas com sequências parciais do gene 16S rRNA (5' – 3') de sangue de gatos domésticos naturalmente infectados na cidade de São Luís - Maranhão, Brasil. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com Bootstrap" de 1.000 repetições.....52

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOPARASITAS E FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* E ANTI-*Neospora caninum*, EM GATOS PERIDOMICILIADOS NA CIDADE DE SÃO LUÍS, MARANHÃO.

Resumo- Poucos relatos têm sido feitos de felídeos domésticos brasileiros a respeito de erliquiose e babesiose, baseados na presença de mórulas em leucócitos e piroplasmas em eritrócitos, respectivamente, e também na presença de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*. O presente estudo teve como objetivo diagnosticar, pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), os principais hemoparasitas e a frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum*, em amostras de sangue e de soro de 200 felídeos errantes na cidade de São Luís-MA, Brasil. Dos 200 animais amostrados, 11 (5,5%) foram reagentes frente ao antígeno de *E. canis*, 5 (2,5%) foram reagentes frente ao antígeno de *Babesia canis*, 101 (50,5%) frente ao antígeno de *T. gondii*, e 49 (24,5%) frente ao antígeno de *N. caninum*, pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Dois (1%) dos 200 animais amostrados foram positivos pela PCR, um para *E. canis* e o outro para *E. chaffeensis*. Os amplicons foram confirmados por sequenciamento, e o DNA de *E. canis* encontrado mostrou 97% de identidade genética com amostras de *E. canis* de cães de diferentes países. Quanto ao DNA de *E. chaffeensis* encontrado, 97% de identidade genética foi encontrada com amostras de *E. chaffeensis* isoladas em diferentes países. Nenhuma das duas amostras positivas para *E. canis* ou *E. chaffeensis* foram positivas para *Babesia canis vogeli* ou *Cytauxzoon* sp. Realizou-se, também, PCR para *Mycoplasma* sp. em amostras de sangue dos felídeos pesquisados; das 200 amostras, 5 (2,5%) foram positivas para *Mycoplasma haemofelis*, 4 (2%) foram positivas para 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*', e 20 (10%) para 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', totalizando 14,5% dos animais. Destaca-se a importância da primeira detecção sorológica de *Ehrlichia* sp. e molecular de *Ehrlichia chaffeensis* em gatos domésticos brasileiros. Ainda, este é o primeiro relato da infecção por *Mycoplasma* sp. em gatos de São Luís-MA.

Palavras-chave: Felídeos, *Mycoplasma* sp., *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*

MOLECULAR DIAGNOSIS OF HEMOPARASITES AND FREQUENCY OF ANTIBODIES ANTI - *Toxoplasma gondii* AND ANTI - *Neospora caninum* IN WANDERING CATS ON THE SÃO LUÍS CITY, MARANHÃO.

ABSTRACT - A few reports have been made in Brazilian domestic felines about ehrlichiosis and babesiosis. These studies are based on the presence of morulae in leukocytes and piroplasms in erythrocytes, respectively, and also in the presence of antibodies anti-*Ehrlichia canis*. This study aimed to diagnose, by the chain reaction Polimerase (PCR), the main hemoparasite and frequency of anti-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in blood samples and serum, respectively of two hundred wandering felines in St. Luís island - MA, Brazil. Of 200 animals sampled, (36%) showed reactivity against the antigen of *E. canis*, five (2.5%) were reactive against the antigen of *Babesia canis*, one hundred and one (50.5%) were reactive against the antigen of *T. gondii*, and forty-nine (24.5%) were also reactive against the antigen of *N. caninum*, by the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). Two (1%) of 200 animals sampled were positive for *E. canis* nPCR, and one to *E. chaffeensis*. The nPCR amplicons were confirmed by sequencing and the DNA of *E. canis* were more closely related to similarity with strains of *E. canis* detected in other countries, with 97% identity. The *E. chaffeensis* DNA was closely related to *E. chaffeensis* detected in other countries, with 97% identity. Neither of the two samples positive for *E. canis* and *E. chaffeensis* were positive to *Cytauxzoon*. Moreover, 14.5% of the animals were positive to *Mycoplasma* sp: five samples (2.5%) were positive for *Mycoplasma haemofelis*, four (2%) were positive for 'Candidate *Mycoplasma turicensis*' and twenty (10%) to 'Candidate *Mycoplasma haemominutum*'. This study was the first serological detection of *Ehrlichia* sp and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian domestic cats. Besides, this is the first report of *Mycoplasma* sp infections in cats from São Luís-MA.

Keywords: Felidae, *Mycoplasma* sp., *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*

1. INTRODUÇÃO

Dentre os ectoparasitas mais comumente conhecidos como transmissores de doenças em felinos domésticos destacam-se as pulgas da família Pulicidae e os carrapatos da família Ixodidae. Entretanto, o potencial desses artrópodes na transmissão de doenças em gatos domésticos ainda não está totalmente elucidado. Dentre os carrapatos da família Ixodidae, o *Rhipicephalus sanguineus* é um dos principais transmissores da erliquiose e babesiose em cães e gatos no Brasil.

Erliquioses são importantes doenças transmitidas por bactérias do gênero *Ehrlichia*, pertencentes à família Anaplasmataceae, sendo bactérias pleomórficas, Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, que infectam plaquetas, células endoteliais, monócitos, macrófagos, eritrócitos e células de invertebrados podem ser também infectadas, dependendo da espécie de erliquia. A bactéria reside no interior da célula hospedeira, dentro de corpúsculos de inclusão, em estruturas denominadas mórulas. Essas bactérias infectam vários tipos de animais, como cães, cavalos, ruminantes, camundongos, humanos e, recentemente, pesquisas indicam que elas podem ser também patogênicas para gatos. Assim como a erliquiose, a babesiose felina pode ser transmitida por carrapatos, entretanto o vetor ainda não foi identificado. São poucos os relatos de babesiose felina no Brasil, e a espécie observada em gatos doentes ainda não foi caracterizada. As formas intraeritrocitárias de *Cytauxzoon felis* podem ser confundidas com *Babesia felis*. A babesiose em felinos domésticos é causada por *Babesia felis*, *Babesia cati*, *Babesia canis* e *Babesia canis presentii*.

Em muitos estudos epidemiológicos realizados em diversas partes do mundo, demonstrou-se que a Toxoplasmose felina é de grande importância, visto que os felídeos domésticos e silvestres são considerados os hospedeiros definitivos, nos quais ocorrem o ciclo sexuado e o assexuado. O *Toxoplasma gondii* infecta todos os animais de sangue quente, incluindo o homem. Somente os gatos eliminam os oocistos, mas muitos vertebrados e invertebrados podem ser hospedeiros transportadores de oocistos de *T. gondii*. Cães podem ingerir fezes de gatos

infectados com *T. gondii*, os quais passam pelas fezes dos cães como não esporulados, e principalmente as crianças podem adquirir infecção, ao acariciar os cães e depois involuntariamente, levam os oocistos à boca. Dessa forma, os gatos têm um papel importante na transmissão de infecção aos animais e ao homem. Muitos anos após a descoberta do *T. gondii*, outro protozoário Apicomplexa (possuem aparelho apical), *Neospora caninum*, foi descrito infectando cães e, por muito tempo, foi confundido com o *T. gondii*, mas apresentava duas diferenças importantes: a neosporose é primariamente uma doença de bovinos. Cães e outros canídeos são considerados hospedeiros definitivos; a toxoplasmose é primariamente doença de humanos, ovinos, caprinos, e os felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*. Os gatos são considerados hospedeiros intermediários para *N. caninum*. Poucos são os estudos de soroprevalência da neosporose felina.

Os gatos também podem ser infectados pelas várias espécies de micoplasma, agentes causadores de hemobartonelose, ou anemia infecciosa felina. Gatos anêmicos devem ter diagnóstico diferencial para outros hemoparasitas. Vetores artrópodes, como carrapatos e pulgas, são potenciais transmissores das micoplasmoses entre felinos. Entretanto poucos estudos têm sido realizados sobre a identificação dos hemoplasmas em pulgas e carrapatos, embora o contato físico entre os gatos favoreçam a transmissão direta do agente.

Os animais domésticos, tais como: cães, gatos, coelhos e cavalos vêm sendo utilizados em psicoterapias com crianças e idosos, favorecendo o contato mais íntimo dos seres humanos com esses animais, possibilitando a transmissão das infecções infectoparasitárias para os humanos.

O diagnóstico das doenças acima descritas em gatos é difícil e pouco utilizado pelos médicos veterinários, exceto o diagnóstico de *T. gondii*. Questões sobre a frequência de transmissão e fatores de risco dessas doenças para a população humana estão pouco compreendidas, razão pela qual este trabalho busca contribuir com o diagnóstico sorológico e molecular de toxoplasmose, neosporose, erliquiose, babesiose e micoplasmose, em uma amostra da população felina, na cidade de São Luís-MA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erliquioses em felinos domésticos

A erliquiose é uma doença transmitida por vetores artrópodes, sendo de grande importância mundial para a saúde animal e humana. O vetor de maior importância na transmissão da enfermidade é o carrapato, mais especificamente o *Rhipicephalus sanguineus* (COUTO. 1998). Essa doença tem distribuição cosmopolita, e o cão é seu hospedeiro principal (GROVES et al. 1975). Poucos estudos têm sido feitos com relação à erliquiose em felinos (ALMOSNY & MASSARD. 1999), nos quais os sinais clínico-laboratoriais são semelhantes aos da erliquiose canina (ALMOSNY & MASSARD. 1999; BEAUFILS et al. 1999). A patogênese e a rota de transmissão da erliquiose em gatos não são bem conhecidas. Gatos domésticos podem ser reservatórios para erliquias que infectam outros animais, inclusive humanos (STUBBS et al. 2000).

2.1.1 Agentes Etiológicos

Erliquias são bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, imóveis, de forma ovoide a elipsoidal, que residem em fagossomos. Pertencem à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, subdivisão α das Proteobactérias, que causam doenças em animais e no ser humano (WALKER & DUMLER. 1996; DUMLER et al. 2001; PADDOCK & CHILDS, 2003). Interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados mantêm esses microrganismos na natureza (DUMLER et al. 2001; PADDOCK & CHILDS. 2003). O gênero *Ehrlichia* compreende espécies filogeneticamente relacionadas, entretanto, geneticamente e antigenicamente diferentes (YU et al. 2006).

Uma proposta de reclassificação feita por DUMLER et al. (2001) dividiu os membros da ordem Rickettsiales em duas famílias: Rickettsiaceae (organismos que ocupam compartimentos intracitoplasmáticos pertencentes ao gênero *Rickettsia* e

Orientia), e *Anaplasmataceae* (organismos que ocupam vacúolos intracitoplasmáticos pertencentes aos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*). As espécies *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* agente da HGE (Erlíquiose Granulocítica Humana), *Ehrlichia platys* e *Ehrlichia bovis* foram agrupadas no gênero *Anaplasma*; *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* *Cowdria ruminantium* no gênero *Ehrlichia*; *E. sennetsu* e *E. risticii* no gênero *Neorickettsia*; e *Wolbachia pipientis* no gênero *Wolbachia*.

Os agentes erliquiais, *E. canis* (BREITSCHWERDT et al. 2002; YIN-CHIACHUN et al. 2003), *Anaplasma phagocytophilum* (BJOERSDORFF et al. 1999) e *Neorickettsia risticii* (DAWSON et al. 1988) podem parasitar felídeos domésticos e selvagens. *E. canis* tem sido relatada como sendo a espécie mais comum encontrada em cães e está presente em 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em vários Estados do Sudeste, Sul, Centro-oeste e Nordeste do Brasil. Poucos relatos têm sido efetuados para erliquiose em gatos. Entretanto, diversos autores demonstram a capacidade potencial de transmissão desse agente para felídeos (ALMOSNY & MASSARD, 1999; OLIVEIRA et al. 2000; LABARTHE et al. 2003; DAGNONE et al. 2003).

2.1.2 Transmissão e Ciclo Biológico da *Ehrlichia canis*

A *Ehrlichia canis*, agente patogênico mais comum da erliquiose canina, infecta leucócitos mononucleares, formando inclusões citoplasmáticas chamadas mórulas. Estas inclusões, de aspectos compactos, são formadas por pequenas estruturas agrupadas, variando de forma cocoide a elipsoidal (RISTIC & HUXSOLL, 1984). De acordo com NYINDO et al. (1971), o desenvolvimento das mórulas inicia-se em um único corpúsculo elementar dentro do monócito, que se multiplica formando inclusões citoplasmáticas imaturas, conhecidas como corpúsculos iniciais, os quais se desenvolvem após 7 a 12 dias de incubação, formando as mórulas. Muitos monócitos, nesse estágio, estão três a quatro vezes maiores que o seu tamanho original (NYINDO et al. 1971). Em gatos, a rota de transmissão da *Ehrlichia* sp. não é conhecida;

entretanto acredita-se que a maioria das espécies são transmitidas por vetores artrópodes. Outros agentes da família Rickettsiaceae, *Coxiella burnettii*, têm transmissão oral em gatos. Vetores artrópodes e rotas orais de transmissão poderão ser consideradas, em futuros estudos de erliquiose em gatos (PEAVY et al. 1997).

Em cães, o principal mecanismo de transmissão natural da *Ehrlichia* sp. é por meio da saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que, ao se alimentar, inocula a bactéria nos animais suscetíveis (EWING, 1969). O carrapato se infecta ao ingerir sangue contendo a bactéria, que é capaz de se multiplicar nos hemócitos, nas células das glândulas salivares e do intestino (SMITH et al. 1976); a transmissão ocorre de forma transtadial e não transovariana (GROVES et al. 1975; SMITH et al. 1976).

O ciclo de desenvolvimento da *Ehrlichia* sp. na célula hospedeira inicia-se com a adesão de pequenas células densamente coradas (CD), as quais acabam por penetrar na célula. Dentro do vacúolo da célula hospedeira, as células densas se transformam rapidamente em células reticuladas (CR). Estas se multiplicam por divisão binária, aproximadamente em 48 horas e, após 72 horas de infecção, maturam e transformam-se em células densas novamente. Em seguida, são liberadas da célula hospedeira e recomeçam um novo ciclo de infecção (ZHANG et al. 2006).

2.1.3 Detecção direta por meio de esfregaços sanguíneos

A primeira descrição da presença de mórulas em células sanguíneas mononucleares de felinos domésticos foi realizada na França, em 1986 (CHARPENTIER et al. 1986). LEWIS JR. et al. (1975) relataram, em felinos domésticos experimentalmente infectados com *E. equi* (*Anaplasma phagocytophilum*), a presença de mórulas em eosinófilos 7 a 8 dias pós-infecção.

Em Nairobi (Quênia), BUORO et al. (1989) observaram a presença de mórulas em monócitos e linfócitos circulantes de 3 felinos domésticos doentes e infestados por carrapatos *Haemaphysalis leachi*. O agente foi cultivado *in vitro* e apresentou metabolismo comum ao gênero *Ehrlichia* (BUORO et al. 1989).

Nos EUA, a primeira descrição de mórulas em células mononucleares de felinos domésticos foi realizada no Colorado. O animal apresentou também sinais clínicos sugestivos, presença de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*N. risticii* e resposta terapêutica à doxiciclina (BOULOY et al. 1994).

No Brasil, a primeira descrição da erliquiose felina foi realizada por ALMOSNY et al. (1998), os quais observaram a presença de mórulas em leucócitos mononucleares e polimorfonucleares em esfregaço sanguíneo de um felino doméstico com achados clínico-laboratoriais sugestivos de erliquiose.

O esfregaço citológico, a partir da camada leucocitária e linfonodos, tem sido utilizado para diagnóstico definitivo da erliquiose em sua fase aguda. Entretanto, as mórulas devem ser diferenciadas de estruturas intra e extracelulares semelhantes a elas, tais como: plaquetas, material nuclear fagocitário em monócitos, grânulos azurófilos em linfócitos e corpos linfoglandulares, a fim de evitar diagnósticos falso-positivos (MYLONAKIS et al. 2003). Tal técnica é rápida e confirmatória, porém a sensibilidade é baixa, em razão do reduzido número de células parasitadas e pode ser afetada pela experiência do microscopista e pelo baixo número de esfregaços e células examinadas (PADDOCK & CHILDS, 2003; MYLONAKIS et al. 2003; PASSOS et al. 2005).

2.1.4 Sinais clínico laboratoriais e achados de necropsia

Gatos domésticos infectados por *E. canis* geralmente apresentam febre, anorexia, perda de peso, apatia, palidez das mucosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia, anemia normocítica e normocrônica, trombocitopenia, leucopenia, aumento das proteínas séricas, transaminases e fosfatase alcalina e globulinemia (BUORO et al. 1989; BUORO et al. 1994; BOULOY et al. 1994; PEAVY et al. 1997; ALMOSNY et al. 1998; ALMOSNY & MASSARD, 1999; STUBS et al. 2000; SHAW et al. 2001; BREITSCHWERDT et al. 2002).

Poucos achados de necropsia têm sido relatados a respeito da erliquiose em gatos, (ALMOSNY & MASSARD, 1999), mas acredita-se que são semelhantes aos da

erliquiose canina (BEAUFILS et al. 1995; BEAUFILIS et al. 1999; BJOERSDORFF et al. 1999).

De acordo com ALMOSNY & MASSARD, (2002), sinais de caquexia, emaciação, diarreia, distúrbio congestivo hemorrágico notavelmente nos pulmões, foram achados anátomo-patológicos em felinos jovens inoculados experimentalmente com *E. canis*.

2.1.5 Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos são os mais frequentemente utilizados para o diagnóstico da erliquiose, entretanto, estudos demonstram que as espécies de erliquias possuem antígenos em comum, gerando reações cruzadas. Sendo assim, requer-se interpretação cuidadosa e correlação dos testes diagnósticos com achados clínicos e epidemiológicos, para evitar designação incorreta do agente sob estudo. A sorologia pode apresentar resultados negativos durante a primeira semana da infecção (WALKER et al. 1996; WANER et al. 2001; PADDOCK & CHILDS, 2003) e não diferencia uma infecção corrente de uma exposição sem estabelecimento de uma doença (SHAW et al. 2001). Há também uma variação entre laboratórios com relação à interpretação de títulos sorológicos (SHAW et al. 2001). A Reação em Cadeia pela Polimerase, (PCR) em combinação com a Reação de Imunofluorescência Indireta, (RIFI) possibilita um diagnóstico rápido e preciso da erliquiose (IQBAL et al. 1994).

Estudos de PERRY et al. (1989) encontraram uma soroprevalência de anticorpos anti-*N. risticii* de 16,6%, em 48 amostras de felinos domésticos, oriundos de fazendas do Estado de Maryland (EUA), nas quais a Febre do Cavalo de Potomac (erliquiose monocítica equina) era considerada endêmica, indicando, assim, a necessidade de se estudar o possível papel dos felinos na epidemiologia dessa doença.

BOULOY et al. (1994), em estudo com 17 felinos domésticos nos EUA, mostraram soroprevalência de 82,4% e 52,9% para *E. canis* e *N. risticii*,

respectivamente, sendo que oito dos animais apresentaram anticorpos reagentes para ambos os antígenos.

Estudos de MATTHEWMAN et al. (1996) detectaram, em seis soros de felídeos domésticos (12%), anticorpos reativos a proteínas imunodominantes de 27 KDa de *E. canis* pela técnica Western Blotting, da África do Sul e Zimbábue.

Também foram encontrados títulos de anticorpos anti- *N. risticii*, variando de 1:20 a 1:160, em cinco felinos domésticos com sintomatologia compatível com a erliquiose na Califórnia, EUA (PEAVY et al.1997).

De acordo com STUBBS et al. (2000), no Colorado – EUA, soros de 344 felinos domésticos foram coletados para pesquisa de anticorpos contra agentes erliquiais, durante um período de oito anos. Anticorpos anti- *E. canis* e / ou anti- *N. risticii* foram detectados em 22,1% dos animais. Dentre os animais soropositivos, 13,2% foram positivos somente para *E. canis*, 64,5% somente para *N. risticii* e 22,4% para ambos os agentes erliquiais. Os títulos de anticorpos anti-*N. risticii* mostraram-se maiores, em cinco animais, na amostra soropositiva para os dois agentes. Em seis gatos, os títulos de anticorpos foram iguais para os dois agentes sob estudo.

AGUIRRE et al. (2004) estudaram, em Madri, 122 felinos domésticos e verificaram que 10,6% eram soropositivos para *E. canis*, 2,4% para *N. risticii* e 4,9% para *A. phagocytophilum*. Dois animais soropositivos para *N. risticii* e um animal soropositivo para *A. phagocytophilum* foram também soropositivos para *E.canis*, no entanto, todas as amostras foram negativas pela PCR. Em Barcelona, ORTUÑO et al. (2005) detectaram anticorpos anti-*E. canis* em 17,9% de 235 felinos domésticos amostrados, sendo que a maioria dos animais apresentou baixo título de anticorpos.

Na região de Abruzzo, na Itália, anticorpos anti-*E. canis* foram detectados em mãe e filho de dois felinos domésticos, com títulos de 1:160 a 1:2560, respectivamente, em uma população de 203 animais amostrados (VITA et al. 2005)

Trabalhos de SOLANO-GALLEGO et al. (2006) demonstraram uma soroprevalência de 11,3% e 1,8% para *E. canis* e *A. phagocytophilum* respectivamente, em uma amostragem de 168 felinos domésticos da Espanha.

Ainda, BILLETER et al. (2007) avaliaram 460 soros de felinos domésticos dos EUA, quanto à presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum*. Vinte animais (4,3%)

mostraram-se soropositivos, embora negativos para PCR, demonstrando assim que a infecção natural por esse agente erliquial em felinos domésticos não é comum.

2.1.6 Diagnóstico Molecular

A primeira detecção molecular de *E. canis* no Brasil foi realizada por DAGNONE et al. (2003), sendo detectado o DNA do agente em cães atendidos em um hospital Veterinário de Londrina-Paraná, por meio da PCR. Em São Paulo, NAKAGHI et al. (2008), utilizando a *Nested* PCR (nPCR), descobriram DNA de *E. canis* em 16 de 33 cães (53,33%) com suspeita clínica de erliquiose da rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, no município de Jaboticabal.

A nPCR é altamente sensível, pois é capaz de detectar 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis*, enquanto uma só amplificação de DNA permite detectar apenas valores acima de 20 pg. Após testar a nPCR com *primers* de acordo com a sequência do gene 16S rRNA para o gênero *Ehrlichia* sp. na primeira amplificação e *primers* específicos para *E. canis* na segunda amplificação, WEN et al. (1997) inferiram que a nPCR é altamente sensível e específica para a detecção de DNA de *E. canis*, a qual pode ser útil para o diagnóstico laboratorial e para monitoramento da terapia antimicrobiana contra o referido agente. A realização de uma PCR amplificando DNA de todas as espécies de erliquias seguida por sequenciamento é uma ferramenta útil para o estudo epidemiológico da infecção erliquial em carrapatos e vertebrados (INOKUMA et al. 2001). Sempre que possível, fragmentos amplificados pela PCR devem ser sequenciados para confirmar e validar os resultados, principalmente quando o ensaio é feito para diferenciar outras espécies de *Ehrlichia*, de outros animais que não cães (HANCOCK et al. 2001; MASSUNG & SLATER, 2003).

Na Suécia, BJOERSDORFF et al. (1999) descreveram o primeiro relato de erliquiose granulocítica felina por *A. phagocytophilum* confirmado pela PCR e pelo sequenciamento.

O DNA de *E. canis* foi detectado pela primeira vez em 3 felinos domésticos com manifestações clínicas de erliquiose, entretanto, soronegativos para o antígeno de *E. canis* (BREITSCHWERDT et al. 2002).

No Taiwan, DNA de *E. canis* por nPCR foram detectados em 2 dos dezessete (11,76%) felinos domésticos. Estes se apresentavam soronegativos e anêmicos (YIN-CHIACHUN et al. 2003).

ISHAK et al. (2006) não detectaram DNA de agentes erliquiais dentre uma amostra de gatos anêmicos, sugerindo que esses hemoparasitas são uma causa incomum de anemia em gatos. Além do mais, esses autores admitem que estas infecções são raras e geograficamente definidas.

Na América do Norte, o primeiro relato da infecção por *A. phagocytophilum* em gatos foi realizado por LAPPIN et al. (2004), sendo confirmado por meio de sorologia e PCR para este agente. Em Barcelona, encontraram um animal positivo na PCR para os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* entre cem gatos domésticos (TABAR et al. 2007).

2.2 Babesiose em felinos domésticos

A babesiose é causada pela infecção de protozoários parasitas Apicomplexas intraeritrocitários, pertencentes ao gênero *Babesia*, sendo uma das infecções de animais de vida livre mais comuns em todo o mundo. São capazes de infectar uma grande variedade de vertebrados e necessitam de hospedeiros vertebrados e invertebrados para a manutenção do seu ciclo de transmissão. Os parasitas replicam-se nas hemácias dos vertebrados, são conhecidos por piroplasmas em virtude da sua dupla aparência de pera (HOMER et al. 2000).

Grandes e pequenos piroplasmas têm sido relatados em vários felídeos domésticos (PENZHORN, 2006a; UILENBERG, 2006). A maioria dos relatos são de microrganismos observados em esfregaços sanguíneos, realizados randomicamente em animais sadios; apenas uma minoria de casos são incriminados como agentes causadores de doenças em seus hospedeiros. *Babesia canis*, assim como a *Ehrlichia canis*, é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é considerado

reservatório para *B. canis vogeli*, mas não para *E. canis*, pois a presença de cães infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos, uma vez que não ocorre transmissão vertical nesses artrópodes (NEER, 1998). Embora se acredite que a babesiose felina seja transmitida por carrapatos, o vetor ainda não foi identificado. Felídeos domésticos podem ser parasitados por *Babesia felis* (DAVIS et al. 1929), *Babesia cati* (MUDALIAR et al. 1950), *Babesia canis canis* (CRIADO-FORNELIO et al. 2003) e *Babesia canis presentii* (BANETH et al. 2004).

Morfologicamente, as babésias são classificadas em pequenos piroplasmas (< 1,5µm) e grandes piroplasmas (> 2,5µm). Pequenos piroplasmas encontrados em felinos incluem *B. felis*, *B. leo*, *B. cati*, *B. pantherae*, *B. canis canis*, *B. canis presentii* e *B. herpailuri* (YABSLEY et al. 2006).

Baseado em análises moleculares, os piroplasmas são classificados em quatro grandes grupos: *Babesia stricto sensu* (as “verdadeiras” babésias); *Theileria* e *Cytauxzoon*; Piroplasmas de humanos e de animais selvagens; *B. microti* e pequenas babésias (KJEMTRUP et al. 2000). As duas subespécies de *B. canis* encontradas em felinos domésticos são colocadas no grupo das verdadeiras babésias (grupo1) (CRIADO-FORNELIO et al. 2003; BANETH et al. 2004). Já os piroplasmas de felídeos africanos (*B. leo* e *B. felis*) e a espécie relacionada à *B. microti* (referida como *Theileria annae*), encontrada em Portugal, estão incluídas no grupo das pequenas babésias/ *B. microti* (PENZHORN et al. 2001).

Estudos soropidemiológicos para *Babesia* sp. em felinos domésticos são escassos. A dificuldade de se detectar o parasita em infecção recente ou na fase crônica da babesiose conduz à pesquisa de anticorpos por meio de métodos sorológicos. As técnicas usualmente empregadas são a Reação de Imunofluorescência Indireta e o Ensaio Imunoenzimático Indireto (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER & MACINTIRE, 2003; PASSOS et al. 2005).

A babesiose felina é caracterizada por anorexia, letargia, palidez das mucosas e perda de peso (FUTTER & BELONJE, 1980; BREITSCHWERDT, 1990; SCHOEMAN et al. 2001; PENZHORN et al. 2006b). Anemia regenerativa macrocítica e hipocrômica (resultante da hemólise intra e extracelular ou imunomediada),

presença de eritrócitos nucleados, reticulócitos, marcada anisocitose, policromasia, eritrofagocitose e corpúsculo de Howell-Jolly são achados comuns na babesiose felina (FUTTER et al. 1980; JACOBSON et al. 2000; SCHOEMAN et al. 2001; PENZHORN et al. 2006a). Em contraste com a babesiose canina, a babesiose felina não está frequentemente associada à febre, icterícia, trombocitopenia e dano renal (FUTTER et al. 1981; SCHOEMAN et al. 2001; PENZHORN et al. 2006a).

No Brasil, a primeira descrição de piroplasma intraeritrocitário em felídeos foi realizada por MENDES-DE-ALMEIDA et al. (2004), em uma colônia urbana de gatos (*Felis catus*) de um zoológico do Rio de Janeiro, em que se observou a presença de piroplasma indistinguíveis entre *Cytauxzoon* spp. e *Babesia* spp., em 47% dos animais. Em Pernambuco, DANTAS-TORRES & FIGUEREDO (2006) encontraram inclusões intraeritrocitárias pequenas e pleomórficas com formato de manchas arredondadas, semelhantes àquelas já observadas por GAZETA et al. (2004), em gatos do Brasil, as quais se assemelhavam a piroplasmas

Mais recentemente, ANDRÉ et al. (2009) detectaram DNA de *Cytauxzoon* em amostras de sangue de sete felídeos selvagens, assintomáticos, capturados na Associação da Mata Ciliar (AMC) de Jundiá, São Paulo. O *Cytauxzoon felis*, é um piroplasma da família Theileriidae que, em vertebrados, o ciclo de vida inclui uma fase eritrocítica e uma tecidual (GREENE. 2006).

2.3 Toxoplasmose e Neosporose em felinos domésticos

A toxoplasmose é uma zoonose parasitária de distribuição cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, que pode infectar o ser humano e animais de sangue quente. Os felídeos são os hospedeiros definitivos, nos quais ocorre o estágio sexual do parasita (TENTER, 1999). De forma geral, os gatos domésticos domiciliados são infectados pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de carne crua ou mal cozida; e os semidomiciliados ou selvagens, pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de pequenas presas, como pássaros e roedores, que representam importantes vias de infecção. Outros

animais podem se infectar pela ingestão de água e alimentos contaminados com fezes de gatos contendo oocistos ou pela ingestão de cistos de animais infectados (LUCAS et al. 1999).

Um hospedeiro suscetível pode se infectar pelo *T. gondii* de três formas: ingerido taquizoítos eliminados na urina, leite, esperma ou ingerindo taquizoítos ou cistos contendo bradizoítos na carne crua ou mal cozida. As formas de taquizoítos que chegarem ao estômago são destruídas, entretanto, as que penetrarem na mucosa oral podem evoluir, do mesmo modo que os oocistos e cistos. Essa fase inicial da infecção, também conhecida como fase proliferativa da doença, caracteriza a fase aguda da enfermidade. Nesta fase, a evolução da doença pode ir até a morte do hospedeiro, principalmente em fetos e indivíduos imunossuprimidos, ou diminuir e cessar pelo aparecimento de anticorpos específicos (DUBEY & FRENKEL, 1972). Com o aparecimento da imunidade, os parasitas extracelulares desaparecem do sangue, linfa e de órgãos viscerais, havendo diminuição da multiplicação intracelular (DUBEY & FRENKEL, 1972; DUBEY & FRENKEL, 1974; DUBEY & BEATTIE, 1988; KAWAZOE, 1995). Os taquizoítos resistentes desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoítos, que formarão os cistos, principalmente no cérebro, musculatura esquelética e cardíaca (DUBEY et al. 1998). Essa fase cística, juntamente com a diminuição da sintomatologia constituem a fase crônica da doença, que pode permanecer por longos períodos devido a mecanismo ainda não totalmente esclarecido (diminuição da imunidade ou alterações hormonais), podendo haver reagudização, com sintomatologia semelhante à primoinfecção (DUBEY & FRENKEL, 1972; DUBEY & FRENKEL, 1976; DUBEY & BEATTIE, 1988).

A fase sexuada ocorre somente nas células epiteliais do intestino delgado dos gatos domésticos e de outros felídeos, os quais são considerados hospedeiros de bradizoítos definitivos (DUBEY & BEATTIE, 1988). A ingestão de cistos teciduais leva à liberação de bradizoítos que darão início ao ciclo enteroepitelial com a produção de oocistos não esporulados no intestino delgado; outros bradizoítos podem iniciar o desenvolvimento como taquizoítos em diversas células do organismo, produzindo infecções crônicas. Essa é a via de transmissão mais comum, ocorrendo principalmente quando os filhotes começam a caçar pássaros ou pequenos mamíferos

ou ingerem carcaças trazidas pelas suas mães (CHILDS & SEEGAR, 1986; DUBEY & BEATTIE, 1988).

Normalmente, o *T. gondii* parasita o hospedeiro sem produzir sinais clínicos, mas leva à formação de cistos latentes que podem persistir durante a vida do indivíduo. A toxoplasmose pode levar à infecção transplacentária, causando aborto, natimortos e morte de gatos antes do desmame. Os sinais clínicos refletem inflamação do fígado, pulmão e sistema nervoso central. Anorexia, letargia, dispneia, febre intermitente, perda de peso e outros sinais inespecíficos, também podem ser encontrados (DUBEY et al. 2009).

O período de prepatência dura de uma a três semanas e um único gato pode excretar milhões de oocistos, em geral sem sinais clínicos (DUBEY & FRENKEL, 1972). Todos os sexos, idades e raças de gatos domésticos são suscetíveis à infecção (DUBEY, 1977), e aqueles com menos de um ano de idade produzem o maior número de oocistos; animais adultos não infectados também eliminam oocistos ao ingerirem cistos, mas a excreção é menor e por um período mais curto (DUBEY, 1977; DUBEY & BEATTIE, 1988; LINDSAY et al. 1997). Menos de 50% dos gatos eliminam oocistos após a ingestão de taquizoítos ou oocistos, no entanto, todos os gatos eliminam cisto teciduais (DUBEY & FRENKEL, 1976).

Os felídeos adquirem uma imunidade intestinal após uma primoinfecção, e não é comum a reexcreção de oocistos. No entanto, DUBEY, (1995) observou uma nova eliminação de oocistos em 55% de gatos desafiados seis anos após a infecção primária. Além disso, alguns gatos podem eliminar novamente oocistos, mesmo sem reinfecção, quando imunossuprimidos ou infectados com *Isospora* (CHESSUM, 1972; DUBEY & FRENKEL, 1974; DUBEY, 1976).

A prevalência de anticorpos para *T. gondii* em gatos nos diferentes Estados do Brasil varia de 10,2% (Rio Grande do Sul) a 90,63% (Amapá e Roraima) (FIALHO et al. 2009). Na bibliografia consultada, não foi possível encontrar trabalhos soropidemiológicos na população felina de São Luís do Maranhão, com poucos trabalhos em outras espécies, tais como caprinos (BRANDÃO et al. 2009b) e ovinos (BRANDÃO et al. 2009a).

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, que pertence ao filo Apicomplexa, reconhecido como uma nova espécie e gênero, em 1988. Esse parasita era confundido com *T. gondii* (DUBEY et al. 1988). Desde a sua descoberta, em 1974, em cães da Noruega (BJERKAS et al. 1984), e sua descrição como um novo gênero e espécie, a neosporose tem se apresentado como doença grave em bovinos e cães, em todo o mundo (DUBEY et al. 2007). *Neospora caninum*, parasita vários tipos de animais, como: cães, gatos, bovinos, bubalinos caprinos, ovinos, equinos, cervídeos, rinocerontes, guaxinis e macacos (DUBEY et al. 2007). Gatos não são hospedeiros definitivos de *N. caninum*, entretanto são considerados hospedeiros intermediários (DUBEY, 1996; McALLISTER et al. 1998).

Anticorpos para *N. caninum* foram detectados em amostras de soros de 282 gatos, provenientes de quatro colônias próximas a Turin, Nordeste da Itália. Os soros foram testados pelo Teste de Aglutinação para *N. caninum* (NAT). A soroprevalência foi de 24,8% na diluição 1:80, 12,% na diluição 1:160 e 53% na diluição 1:320. A soroprevalência em machos e fêmeas nas diferentes colônias e em diferentes idades não foi significativa (FERROGLIO et al. 2005).

Ocorrência de anticorpos para *N. caninum* e *T. gondii*, em 400 gatos domésticos, das raças siamês, persa e sem raça definida, oriundos do município de Araçatuba, São Paulo, foi detectada pela RIFI. Dos 400 gatos, 100 foram soropositivos para *T. gondii* e 98 soropositivos para *N. caninum*. A taxa de soropositividade dos gatos para *T. gondii* foi correlacionada com a idade, sendo 219 gatos jovens de até um ano de idade e 181 mais velhos, correspondendo a 13% e 39,2% de positividade para *T. gondii*, respectivamente. A presença de *N. caninum* quando correlacionada com a idade, foi detectada em 18,7% (41/219) em animais abaixo de 12 meses e 31,5% (57/181) em animais acima de 12 meses (BRESCIANI et al. 2006).

2.4 Micoplasmose em felinos domésticos

Micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas) são os agentes causadores da anemia infecciosa. São bactérias desprovidas de parede celular que infectam células vermelhas de várias espécies de mamíferos (WILLI et al. 2007). Anteriormente, os hemoplasmas eram classificados na ordem Rickettsiales, de acordo com a morfologia e resposta à terapia do antibiótico (WEISS & MOULDER, 1984). Entretanto, estudos moleculares de acordo com a morfologia do gene 16S rRNA mostrou que o gênero *Haemobartonella* e *Eperythozoon* são mais relatados no grupo de micoplasmas causadores de pneumonia, levando à reclassificação dentro do gênero *Mycoplasma* (RIKIHISA et al. 1997; NEIMARK et al. 2001). Esses parasitas possuem pequeno genoma, o qual proporciona uma estrita dependência da célula hospedeira, variam em tamanho de 0,3 a 1 μm de diâmetro e podem ser encontrados na forma de anéis agregados, formando uma engrenagem na superfície das células vermelhas do sangue (MESSICK, 2004). Esses microrganismos são de difícil crescimento fora de seus hospedeiros em cultura.

Os micoplasmas estão distribuídos mundialmente. A forma de transmissão ocorre através da sucção de sangue por artrópodes. Esses carrapatos e pulgas são suspeitos de estarem envolvidos na transmissão de hemoplasma entre gatos domésticos. (SHAW et al. 2004; LAPPIN et al. 2006). A pulga *Ctenocephalides felis* comumente ingere *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (WOODS et al. 2005; LAPPIN et al. 2006), sendo comum em gatos no Brasil, (PEREIRA & SANTOS, 1998). Em regiões tropicais, a prevalência de micoplasmas hemotróficos é alta em razão das condições ambientais, favorecendo, desse modo, a transmissão desses parasitas pelos vetores (MACIEIRA, et. al. 2008; MACIEIRA et. al. 2009). A doença é caracterizada por anorexia, letargia, desidratação e perda de peso. A hemoplasmose animal varia de uma severa anemia para uma infecção crônica, sem sinais clínicos. Animais infectados na fase aguda podem apresentar anemia hemolítica, anorexia, febre, icterícia e hipoglicemia, dependendo da espécie de hemoplasma envolvida. A forma crônica da doença tem sido

comumente associada à ausência de sinais clínicos. Entretanto, consequências de infecção por longo prazo são ainda obscuras; animais cronicamente infectados podem tornar-se anêmicos e imunossuprimidos (HOELZLE, 2008).

Historicamente, o diagnóstico da infecção é realizado pelo esfregaço sanguíneo; esses parasitas são encontrados muito juntos dos eritrócitos. Alguns microrganismos podem também ser encontrados no plasma por causa do desgarramento dos parasitos das células. Devido ao ciclo da parasitemia e infecção crônica, essa técnica não é sensível nem específica para o diagnóstico da infecção. Consequentemente, técnicas de diagnóstico molecular, como a PCR em tempo real, têm sido intensivamente e sucessivamente utilizada para identificar animais com infecção aguda e crônica (MESSICK, 2004; HOELZLE, 2008).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pelas infecções por hemoplasma em animais domésticos e selvagens no Brasil. São três espécies diferentes de micoplasmas que infectam gatos domésticos: *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (FOLEY et al. 1998; FOLEY et al. 2001; NEIMARK et al. 2001; TASKER et al. 2004.) e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', (WILLI et al. 2005; WILLI et al. 2006). Esses parasitas foram detectados no Brasil por técnicas moleculares, em gatos domésticos e selvagens (WILLI et al. 2007; MORAIS et al. 2007; SANTOS, 2009). Vários estudos mostram que hemoplasmas felinos são mais encontrados em gatos machos (BAUMANN et al. 2006; MORAIS et al. 2007; SANTOS 2008). Estudos utilizando a PCR em amostras de sangue de 37 gatos oriundos do hospital veterinário de Curitiba, demonstraram que 14 gatos (38%) foram positivos para *M. haemofelis*; 4 (11%) para '*Candidatus M. haemominutum*,' e 3 (8%) foram coinfectados com ambos os microrganismos (BAUMANN et al. 2006). SANTOS (2008), que trabalhou com esfregaços sanguíneos em felídeos domésticos, verificou a presença de anticorpos para hemoplasma pela PCR em apenas 1/3 das amostras.

Na América do Sul, estudos moleculares identificaram coinfecção com *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' em três gatos domésticos, utilizando o gene 16S rRNA (MORAIS et al. 2007), que constitui na caracterização molecular dos 2 agentes.

Em Porto Alegre, 371 gatos foram testados pela PCR para os três hemoplasmas felinos. A espécie mais prevalente neste estudo foi '*Candidatus M. haemominutum*' com 50 gatos positivos (13,5%), enquanto '*Candidatus M. turicensis*' e *M. haemofelis* foram encontrados em 10 (2,7%) e 8 gatos (2,2%), respectivamente (SANTOS, 2009). Neste estudo, gatos machos com acesso ao ambiente livre foram provavelmente mais infectados com hemoplasma. Esse foi também o primeiro relato de '*Candidatus M. turicensis*' em gatos do Brasil.

Em um estudo realizado em um hospital veterinário de pequenos animais, em São Paulo, DNA de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. turicensis*' foram detectados pela PCR e confirmou a presença do gene 16S rRNA, em 23 (8,5%) e 1 (0,37%) suspeito, dentre 270 gatos anêmicos, respectivamente (HORA, 2008).

Outro estudo comparou 80 gatos saudáveis e 74 gatos doentes oriundos de Araçatuba, Estado de São Paulo; 8 (10%) dos gatos saudáveis e 15 (20%) dos gatos sintomáticos foram positivos para *M. Haemofelis* e ou '*Candidatus M. haemominutum*', respectivamente, (BATISTA, 2004). De 23 amostras positivas. 11 foram positivas para *M. haemofelis*, 4 foram positivas para '*Candidatus M. haemominutum*' e 8 estavam coinfectadas com ambos os microrganismos. Associação entre sinais clínicos e infecção com *M. haemofelis* foi observada, sugerindo uma alta virulência de *M. haemofelis*, quando comparado com '*Candidatus M. haemominutum*.' Estudos de MACIEIRA et al. (2009) verificaram a prevalência e fatores de risco para hemoplasmas em gatos domésticos naturalmente infectados com o vírus da imunodeficiência felina e / ou vírus da leucemia felina. Cento e quarenta e nove gatos do Rio de Janeiro foram testados para hemoplasmas utilizando a PCR e Southern blotting; 15 (10%) foram positivos para '*Candidatus M. haemominutum*', 6 (4%) para *M. haemofelis* e 3 (2%) foram coinfectados com ambos hemoplasmas. Gatos que são infectados com hemoplasmas e retrovírus podem ter um grande risco de desenvolver leucemia, linfoma e síndrome da imunodeficiência (PRIESTER & HAYES, 1973; COTTER et al. 1975; BOBADE et al. 1988; GEORGE et al. 2002; HARRUS et al. 2002).

Infecções por hemoplasmas em gatos domésticos têm sido diagnosticadas em todo mundo (JENSEN et al. 2001; LOBETTI et al. 2004; CRIADRO-FORNELIO et al.

2003; TASKER et al. 2003; WATANABE et al. 2003; TASKER et al. 2004; WILLI et al. 2006; WILLI et al. 2007). Entretanto a prevalência da infecção é bastante variável, na dependência da localização geográfica da amostra e da metodologia diagnóstica utilizada. A associação entre a infecção por hemoplasma em gatos tem sido observada com frequência em animais infectados com vírus da imunodeficiência felina (FIV) e com leucemia felina (FeLV) (HORA, 2008). No Brasil, existem relatos da detecção de hemoplasmas em gatos domésticos, felídeos neotropicais de vida livre e de cativeiro. A prevalência da infecção tem sido relatada na ordem de 5% a 12% na dependência da população e da técnica molecular utilizada. SANTOS, (2009) sugere que tais infecções podem também ser transmitidas pelo contato direto entre os gatos, uma vez que '*Candidatus M. haemominutum*' foi detectado pela PCR na saliva e fezes de gatos infectados. Estudos futuros devem ser conduzidos para melhor entender seu impacto em gatos, cães, animais de produção, na fauna silvestre, e também para determinar o seu papel como agentes zoonóticos, particularmente em pacientes imunocomprometidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de infecção por hemoparasitas e protozoários Apicomplexas em gatos peridomiciliados da cidade de São Luís do Maranhão.

3.2 Objetivos específico

- Avaliar a frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Babesia canis*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em soros de gatos;
- Realizar a detecção direta de DNA dos hemoparasitas (*Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Mycoplasma* sp.) em amostras de sangue e sequenciar os produtos da PCR positivos e comparar com as sequências depositadas no GenBank.™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa BLAST.

5. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição da localidade do experimento

A cidade de São Luís é composta pelos municípios de Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar e São Luís.

São Luís está localizada no Atlântico Sul entre as baías de São Marcos e São José de Ribamar. A população é de 1.211.270 habitantes e 45.000 gatos (Centro de Zoonoses do Município de São Luís- dados de 2007). Com relação às coordenadas geográficas, a cidade tem latitude 2°31'71", longitude 44°18'10"; ocupa uma área de 827.141 km², limita-se com os municípios de Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa e com o Oceano Atlântico. (Núcleo/ Geoambiental/Laboratório de Geoprocessamento-São Luís Maranhão-Brasil, 2009). (Figura 01)



Figura 01. Mapa da cidade de São Luís-MA, mostrando os 4 municípios e a localização da cidade. Fonte: Google imagens, acesso no dia 08 de janeiro de 2010.

4. 2 Grupo experimental

Foram utilizados 200 gatos peridomiciliados, adultos com idades entre 1 a 15 anos, sem raça definida (SRD), machos e fêmeas e contactantes com cães. Deste colheram-se 5 mL de sangue total para confecção de esfregaços sanguíneos, teste sorológico e PCR.

4.2.1 Características dos animais

Foram colhidas 200 amostras sanguíneas de gatos domésticos peridomiciliados (*Felis catus*), dos quais a maioria (n = 194) residentes em áreas periféricas da cidade de São Luís-MA e 6 gatos do município de Raposa. Os animais foram selecionados ao acaso, devidamente identificados em fichas numeradas e avaliados clinicamente em busca de sinais clínicos indicativos de doença infecto-parasitária, tais como: apatia, anorexia, palidez de mucosa, estado geral do animal e presença de ectoparasitas.

4.3 Colheita das amostras

Alguns animais foram imobilizados manualmente, utilizando-se luvas de couro e gaiolas. Outros foram contidos quimicamente com o uso de xilazina (1mg/kg) via intramuscular.

Previamente à colheita de sangue, foi realizada a tricotomia da região (membro torácico e/ou pescoço) e assepsia com solução de álcool iodado.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular e/ou cefálica de acordo com o animal e à praticidade. Para isso, utilizaram-se agulhas 25 x 8 mm e seringas estéreis de 10 mL. Para cada animal foram colhidas duas amostras de sangue, sendo 2mL em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para a realização das Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR), e 3mL sem anticoagulante para obtenção de soro para os exames sorológicos.

Todas as amostras foram devidamente identificadas com o nome do proprietário do animal, endereço residencial, bairro e telefone. Posteriormente, os tubos foram armazenados em caixas com gelo, em seguida conduzidos ao Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Agrárias – CCA, da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís – MA. As amostras de sangue e soro foram aliquotizadas em microtubos de 1,5 mL estéreis e mantidas a -20°C. A seguir, foram transportadas em caixas de isopor com gelo ao Laboratório de Imunoparasitologia na FCAV- Unesp, para posterior uso nos experimentos.

4.4 Esfregaços sanguíneos

Utilizou-se uma gota do sangue fresco para confecção de esfregaços sanguíneos, que foram corados pelo corante Giemsa e Romanowsky (Bio Cor®). As lâminas coradas foram acondicionadas em caixas de lâminas de microscopia para, posteriormente, serem examinadas para identificação de mórulas de *E. canis*, em microscopia ótica.

4.5 Sorologia

4.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis*

O substrato antigênico de *Ehrlichia canis*, utilizado para confecção de lâminas de Imunofluorescência Indireta (RIFI), foi obtido a partir de cultura de células DH82 infectadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO¹, em 1993, a partir de um cão fêmea, de raça Weimaraner, em fase aguda da doença (CASTRO et al, 2004; AGUIAR et al. 2007).

¹ MACHADO, R. Z. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Campus de Jaboticabal. Comunicação pessoal 1993.

Amostras de soro foram diluídas, inicialmente, a 1:64 em solução salina de fosfato tamponada PBS pH 7,2 (1,3M NaCl; 27mM KCl; 56 mM Na₂HPO₄; 10mM KH₂PO₄; 9,2 mM NaH₂PO₄). Foram colocados 10µL do soro diluído em cada poço da lâmina com antígeno *E. canis*, reservando-se dois poços para adição das amostras de soros de cão controles positivo e negativo. Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos, da soroteca do Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP, frente ao antígeno de *E. canis*, a partir do momento em que se identificou felídeo positivo, as amostras já testadas foram retestadas com soro de felídeos. O procedimento foi o mesmo para cada lâmina a ser testada. As lâminas foram incubadas a 37°C, por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução de fosfato tamponada PBS pH 7,2 (1,37M NaCl; 26,82mM KCl; 101,44 mM Na₂PO₄; 17,63mM KH₂PO₄), secas, e a cada poço foram adicionados 10µL de conjugado (anti-IgG de gato marcado pelo isotionato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão para os controles positivo e negativo), diluídos conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi incubado por mais 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas na microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou igual a 1:64. A positividade da reação implicou na fluorescência nas mórulas comparativamente às amostras de soros controles positivo e negativo.

4.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

O substrato antigênico para *Babesia canis* foi isolado por HAGIWARA & HOLZCHUH (1987) em um cão, na HOVET FMVZ-SP, São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. O isolado foi mantido criopreservado em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-UNESP. O sangue parasitado foi lavado em PBS pH 7,2 por 5 vezes consecutivas. Esfregaços fixados em metanol e corados

com Giemsa revelaram elevada concentração de merozoítos, ou seja, 20-30 hemácias parasitadas por campo microscópico. Nessas condições, esfregaços preparados em lâminas foram secos à temperatura ambiente, embrulhados em papéis extrafinos e, posteriormente, separados em blocos contendo cinco lâminas, as quais, depois de devidamente etiquetadas, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados, foram mantidos em freezer - 70° C até o momento do uso.

As lâminas contendo o substrato antigênico para *B. canis* foram descongeladas em temperatura ambiente, para realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Em seguida, foram marcadas com 18 pequenos círculos com esmalte vermelho; em cada círculo foram pipetados 10µL de soros diluídos em PBS 1:40. As lâminas foram incubadas por 45 minutos em câmara úmida a 37° C, a seguir foram submetidas a três lavagens por imersão, cinco minutos cada, em solução salina tamponada. Em seguida, foram adicionados 10µL de conjugado (anti-IgG de gato marcado pelo isotionato de fluoresceína, para as amostras testes e anti-IgG de cão para os controles positivo e negativo), diluídos conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi incubado por 45 minutos a 37° C em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas na microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram considerados positivas aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou igual a 1:40. A positividade da reação implicou na fluorescência dos parasitas comparativamente às amostras de soros controles positivo e negativo.

O substrato antigênico para *T. gondii*, usado na reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), foi purificado de taquizoítos obtidos por meio de lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados, de acordo com DOMINGUES et al. (1998). Para a realização das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de *Toxoplasma gondii*, nas lâminas contendo substrato antigênico para *T. gondii* foram pipetados 10µL de soro nos poços. Estas foram incubadas a 37° C por 45 minutos e submetidas a três lavagens por imersão de salina tamponada (PBS), pH 7,2 por 5 minutos. Após secagem, os poços foram recobertos por 10µL de conjugado (anti-IgG de gato marcado pelo isotianato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão para os controles positivo e negativo), diluídos conforme orientação do

fabricante (Sigma®). O material foi incubado por mais 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas na microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram considerados positivos, aqueles soros que reagiram nas diluições maiores ou iguais a 1:40.

Na preparação do substrato antigênico de *Neospora caninum* isolado NC-1 (DUBEY et al. 1998), cultivados em células CV-1, foi utilizado meio RPMI (Sigma Inc. USA) suplementado por soro fetal bovino (BFS) a 2%. Os parasitas foram colhidos pelo tratamento com tripsina a 1% a partir de uma camada mononuclear de células, 3 dias após a infecção e passados para outra garrafa com células CV-1. Os taquizoítos de *N. caninum* recuperados foram utilizados como substrato antigênico.

Na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para *Neospora caninum* o procedimento foi igual ao item 4.4.3, entretanto com algumas modificações: nas lâminas contendo substrato antigênico (*N. caninum*), 10µL de soro foram pipetados nos poços correspondentes, só na diluição 1:25; essas lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos e, após secagem, foram adicionados 10µL de conjugado (anti-IgG de gato marcado pelo isotiocianato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão para os controles positivo e negativo), diluído conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi incubado por mais 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas na microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou igual a 1:25, e a positividade da reação implicou na fluorescência de parasitas comparativamente às amostras de soros controles positivo e negativo.

4.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.6.1 Extração de DNA de Sangue total

A extração de DNA de sangue total foi realizada em 200 amostras com o Qlamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do

fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20°C até a realização da PCR.

4.6.2 Amplificação do DNA do gênero *Ehrlichia* (Identificação Molecular da *Ehrlichia*)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram baseados na sequência parcial do gene 16 S rRNA presente em todos os agentes da família Anaplasmataceae: ECC (5'-GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'). A técnica da PCR foi realizada conforme metodologia descrita por MURPHY et al. (1998), com algumas modificações. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se uma reação de volume total final de 50 µL, contendo uma mistura de 10 µL de DNA - amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10x – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 50µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram: desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, seguida por uma segunda etapa de 30 ciclos contendo a desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento ou hibridização a 65°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Esse processo foi realizado em aparelho termociclador modelo PTC-100™-Peltier-Effect Cycling (MJResearch, Inc.).

4.6.2.1 Amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis* (Nested PCR)

A reação de amplificação do tipo *Nested* para *E. canis* foi realizada utilizando-se os produtos obtidos da primeira amplificação (gênero *Ehrlichia* spp.) como molde para os *primers* para as próximas reações. Para as reações específicas para *E. canis*

foram utilizados os *primers* ECAN5 (5'- CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA - 3') e HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'), de acordo com o protocolo de MURPHY et al. (1998) que amplifica 400pb.

Para a realização da *Nested* PCR foram utilizadas as mesmas soluções da PCR, além de 1µL da amostra do DNA amplificado e os *primers* espécie-específicos. A reação constituiu de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto a 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

4.6.2.2 Amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia chaffeensis* (*Nested* PCR)

A reação de amplificação do tipo *Nested* para *E. chaffeensis* foi realizada utilizando-se os produtos obtidos da primeira amplificação (gênero *Ehrlichia* spp.) como molde para os *primers* para as próximas reações. Para as reações específicas para *E. chaffeensis* foram utilizados os *primers* CHAFF (5'- CAA TTGCTTATAACCTGGTTATAAAT-3') GAIUR (5'- GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3') de acordo com o protocolo de KOCAN et al. (2000), que amplifica 410pb. Para a realização da *Nested* PCR foram utilizadas as mesmas soluções da PCR, além de 1µL da amostra do DNA amplificado e os *primers* espécie-específicos. A reação constituiu de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto, 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

4.6.2.3 Reação de Amplificação do tipo *Nested* PCR para *Ehrlichia* sp. baseada no gene omp-1

A família multigênica omp-1 codifica proteínas externas de membrana que são específicas ao gênero *Ehrlichia*. Esta PCR foi utilizada para aquelas amostras positivas na *Nested* PCR para *Ehrlichia canis*, de acordo com o gene 16S rRNA. Os oligonucleotídios iniciadores (*primers*) foram conP28-F-1 (5' AT (C/T)AGT (GC) AAA(A/G)TA(TC)(AG)T(G/A)CCAA-3') e ConP28R-1(5'TTA (G/A) AA(A/G) G (C/T)AAA(C/T)CT(T/G)CCTCC-3') na primeira reação que amplificam 350pb e conP28-F-2 (5'C AATG G (A/G)(T/A)GG(T/C)CC(A/C)AGA(AG)TAG-3') conP28-R2 (5'-TTCC(T/C)TG(A/G) TAA/G)G(A/C)AA(T/G)TTTAGG-3) na segunda reação que amplificam 350pb. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se um volume total final de 25 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 25 µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A segunda reação da *Nested* PCR foi conduzida com 1 µL do produto amplificado na primeira PCR. E com os *primers* específicos conP28F-2/con28R2 de acordo com INAYOSHI et al. (2004).

4.6.2.4 Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. baseada no gene dsb

Da mesma forma que no exposto acima, as amostras positivas na PCR para *Ehrlichia* sp baseada no gene 16S rRNA foram também submetidas a PCR com base no gene dsb. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

dsb-330 (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') e dsb-728 (5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'), que amplificam um fragmento de 409 pb de *Ehrlichia* sp (DOYLE et al. 2005; LABRUNA et al. 2007). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 50 µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq Platinum (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 50µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 50 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.6.2.5 Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. baseada no gene GroESL

As amostras positivas nas PCRs para *Ehrlichia canis* (2 resultados) de acordo com o gene 16S rRNA foram também submetidas a uma *Nested* PCR de acordo com o gene *groESL* (*heat shock operon*). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) HS1a (5'-AITGGGCTGGTAITGAAAT -3') e HS6a (5'-CCICCIIGGIACIAIACCTTC -3') (SUMNER et al. 1997; NICHOLSON et al.1999) na primeira reação HS43 (5'- AT(A/T)GC(A/T)AA (G/A) GA AGC AT AGTC-3') e HSVR (5'-CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC-3') (LOTRIC-FURLAN et al. 1998) na segunda reação. Os *primers* usados na *Nested* PCR amplificam uma região de 1.200 pb que inclui o final do gene *groESL*, a região entre os genes *groES* e *groEL* e aproximadamente dois terços do gene *groEL*. O gene *groESL* é uma sequência de DNA que codifica um antígeno comum entre as bactérias. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se uma reação de volume total final de 50 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP,

dGTP e dTTP-Invitrogen®), 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 50 µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação para a primeira reação de PCR foi de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 90 segundos, seguidos de 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 48°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a *Nested* PCR foi utilizado 1 µL do DNA amplificado na primeira reação. A sequência térmica e condições de ciclo foram as mesmas da primeira PCR, alterando a temperatura de anelamento para 55°C.

4.6.2.6 Reação de Amplificação para *Ehrlichia* sp. de acordo com o gene citrato sintase (gltA)

As amostras positivas na PCR para *Ehrlichia canis* (n = 2), de acordo com o gene 16S rRNA foram também submetidas a PCR baseada no gene citrato sintase. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) EHR-CS778R(5'-TT(C/T)ATGTC(C/T)ACTGCTGC(G/T)TG-3') e EHR-CS778R (5'-GC(A/T/C/G)CC(A/C)CCATG(A/C)GCTGG-3') que amplifica 650 pb (INOKUMA et al., 2001). A reação de amplificação foi realizada utilizando-se uma reação de volume total final de 50 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 50 µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C

por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.6.3 Reação de Amplificação para *Babesia canis* e *Cytauxzoon* sp. baseada no gene 18S rDNA

As amostras soropositivas para *Babesia canis* (n = 5) foram submetidas à PCR para *B. canis* e *Cytauxzoon*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR para *B. canis* foram de acordo com a sequência parcial do gene da subunidade menor do 18S rDNA presente na maioria das espécies de babesias: Piro A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e Piro B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3') que amplificam 400 pb. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por CARRET et al. (1999), com algumas modificações, utilizando-se as mesmas soluções e concentrações da PCR para *E. canis*, com exceção da Taq Polimerase (Invitrogen®), da qual foi utilizada 0,5 U. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos. Para *Cytauxzoon*, a técnica da PCR foi realizada conforme descrita por BIRKENHEUER et al. (2006) e a sequência parcial do gene da subunidade menor do 18S rDNA: 5'-GCGAATCGCATTGCTTTATGCT-3' e 5'-CCAAATGATACTCCGGAAAGAG-3' que amplificam 300 pb, utilizando-se as mesmas soluções e concentrações da PCR para *Babesia* sp. com exceção da Taq Polimerase (Invitrogen®), da qual foi utilizada 1,25 U e dos oligonucleotídeos iniciadores, (*primers*) dos quais foram utilizados 25pmol. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

4.6.4 Reação de Amplificação para *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' baseada no gene 16S rRNA

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram de acordo com a sequência parcial do gene 16S rRNA: 1183F (5'-GCATAATGTGTC GCAATC -3') e 1290R (5'- GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC -3'). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por FOLEY et al. (1998). A reação de amplificação foi realizada utilizando-se uma reação de volume total final de 25 µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5Mm de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 25 µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos. Os controles positivos de *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus M. haemominutum' foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Joanne Messick (Universidade de Purdue, West Lafayette, Indiana, EUA) e pela professora Dra. Giane Paludo, da Universidade de Brasília (UNB).

4.6.4.1 Reação de Amplificação para *Mycoplasma haemofelis* baseada no gene 16S rRNA

As amostras positivas na PCR segundo o protocolo de FOLEY et al. (1998) foram submetidas à PCR específica para *M. haemofelis*. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA: Hfelis-fl (5'- GACTTTGGTTTTCGGCCAAGG -3') e Hfelis-r3 (5'- CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3'). A técnica da PCR foi realizada conforme

descrita por BERENT et al. (1998), que amplificam 400 pb. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se uma reação de volume total final de 25 μ L, contendo uma mistura de 5 μ L do DNA-amostra, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 25 μ L. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 54 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

4.6.4.2 Reação de Amplificação para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' baseada no gene 16S rRNA

As amostras positivas na PCR, segundo o protocolo de FOLEY et al. (1998), foram submetidas à PCR específica para '*Candidatus M. haemominutum*'. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram de acordo com a sequência parcial do gene 16S rRNA: Cali-F (5' GCATAATGTGTCGCAATC3') (Cali-R (5'GTTTCAACTAGTACTTTCTCC3')). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por SANTOS et al. (2009). A reação de amplificação foi realizada, utilizando-se uma reação de volume total final de 25 μ L, contendo uma mistura de 5 μ L do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen®), 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 25 μ L. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguidos por extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os controles

positivos de '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*' foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Joanne Messick (Universidade de Purdue, West Lafayette, Indiana, EUA).

4.6.4.3 Reação de Amplificação para *Mycoplasma turicensis* baseada no gene 16S rRNA

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram de acordo com a sequência parcial do gene 16S rRNA: MT-Fw (5'-GTATCCTCCATCAGACAGAA-3') e Mt2 -Rv(5'-CGCTCCATATTTAATTCCAA-3'). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por SANTOS et al. (2009), que amplificam 200 pb. A reação de amplificação foi realizada, utilizando-se uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e DTTP Invitrogen®), 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl) e água ultrapura estéril (Invitrogen®) q.s.p. 25 µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos. O controle positivo de *Candidatus Mycoplasma turicensis* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Joanne Messick (Universidade de Purdue, West Lafayette, Indiana, EUA).

4.7 Eletroforese de DNA em gel de Agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,3% corado com brometo de etídio (INVITROGEN®) a 0,5 µL/mL, em

tampão de corrida TEB 1x, pH =8,0 (44,58 M Tris – base; 0,44 ácido bórico 12,49mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador com peso molecular de 100 pares de base (100 pb de DNA Ladder INVITROGEN[®]). Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transluminador de luz ultravioleta (2020 E), acoplado a um programa computacional de imagens (Eagle-Eye-2-stratagene[®]).

4.8 Reações de sequenciamento

4.8.1 Extração dos amplicómeros do gel de agarose

Após a reação de PCR, as bandas referentes foram cortadas do gel de agarose com lâminas de bisturi estéril, pesadas e colocadas em tubos de polipropileno de 2,0mL devidamente identificados. Na sequência, foi realizada extração de produto da PCR em gel de agarose, utilizando-se o kit Genclean II (Q Biogene[®]), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8.2 Quantificação de DNA dos amplicómeros

Cada amostra extraída do gel foi então submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio a 0,01% (INVITROGEN[®]), em cuba horizontal, com solução TEB 1x com fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e trinta minutos com 50mA e 100 V. Um marcador de peso molecular (Low mass DNA Ladder - INVITROGEN[®]) foi adicionado à primeira canaleta de cada gel analisado para se obter uma medida comparativa das quantidades de DNA das amostras.

4.9 Reação de Sequenciamento

Os amplicons purificados e quantificados foram utilizados na concentração aproximada de 80-100ng de DNA - amostras. Inicialmente em gelo, foi preparado um mix da reação composto de 3,5 μL de tampão "Save-Money" (MgCl_2 1M; Tris-HCl, pH 9, água estéril ultrapura q.s.p. 200 μL de "Big Dye" (Big Dye terminator V 3.1, 9 Cycle sequencing, kit Applied Biosystems™) 2 μL de oligonucleotídeo iniciador *forward* que originou o amplímero (na concentração de 5 pmol/ μL). Utilizou-se uma placa de 96 cavidades (PP-PCR plate-Mil Habben Rand Fur ABI, Greiner BW-One™) colocada em gelo e a cada cavidade adicionaram-se, inicialmente, 3 μL de água ultrapura, 1 μL da amostra a ser sequenciada e 6 μL do mix. Para as amostras contendo baixas quantidades de DNA foi adicionado maior volume da amostra e o volume de água foi alterado (q.s.p 100 μL). A placa foi então submetida à centrifugação (centrífuga de placa modelo – Rotina 46 R, Hettich-Zentrifuger™) por 20 segundos a 1.200 RPM e, depois, a placa foi vedada com tampa de silicone e colocada em aparelho termociclador (Programmalle Thermal Controller-Peltier Effect Cucling Cycle, Modelo PTC-100, MJ Research™), com a programação de 35 ciclos por 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 52°C, 4 minutos a 60°C e, finalizando, a 4°C indefinidamente. Após essa etapa, foram acrescentados 80 μL de isopropanol 15% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e incubada em centrífuga a 20°C em 1310 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Adicionaram-se 200 μL de etanol a 70% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e centrifugada (rota 46 R, Hettich-Zentrifuger™) a 20°C em 1310 x g por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Essa etapa foi realizada duas vezes. A placa foi colocada invertida e sem tampa sobre o papel toalha e centrifugada (Rotanta rota 46 R, Hettich-Zentrifuger™) a temperatura ambiente 1310x g por 20 minutos. Posteriormente, a placa foi colocada sem tampa em uma bomba a vácuo (Eduards™) por 5 minutos. Adicionaram-se 9 μL de formamida (HI DI Applied Biosystems™), para cada amostra colocou-se a placa em uma tampa de silicone e colocou-se no aparelho termociclador com a

programação de 95°C por 5 minutos e finalização a 4°C. Logo após sair do termociclador a placa foi colocada em gelo por 3 minutos. Após esse procedimento, a placa foi colocada no aparelho sequenciador (3100 Hitachi Genetic Analyser ABI Prism, Applied Biosystems™).

As reações de sequenciamento foram realizadas no laboratório de Tecnologia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.10 Análise dos Resultados

4.10.1 Análise dos produtos sequenciados

As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram submetidas ao alinhamento e análise no Laboratório de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular (FCAV/UNESP). A trimagem foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base seqüenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. O programa CAP3 (<http://www.pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) foi utilizado para realizar o alinhamento da sequência consenso. O programa BLAST (BENSON et al., 2002) foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), objetivando-se procurar e comparar sequências similares em banco de dados internacionais (GenBank) com aquelas obtidas. As sequências salvas em modo “FASTA” foram analisadas então com o programa CLUSTAL-X (THOMPSON et al., 1997), no qual foram obtidos parâmetros de alinhamento, múltiplos alinhamentos e alinhamentos completos. As sequências foram então salvas em modo “ALN” e utilizadas no programa MEGA-2 (*Phylogenetic and molecular evolutionary analyses – MEGA version 2.1*) (KUMAR et al., 2001). As sequências salvas foram convertidas em modo “meg”, sendo realizados cortes de fragmentos, que são pedaços desalinhados. No programa MEGA foram formadas árvores

filogenéticas. As sequências alinhadas foram reamostradas com *bootstrap* de 1000, com o método *neighbor-joining* e Kimura-2 parâmetros.

5. RESULTADOS

5.1 Sinais clínicos e esfregaços sanguíneos

Dos 200 animais amostrados, observou-se a presença de carrapato em apenas um animal. O ectoparasita foi identificado no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UEMA-MA, como sendo *Rhipicephalus sanguineus*. Dentre a amostra total (n=200), 74 animais (37%) apresentavam palidez das mucosas, 35% com secreção ocular, 10 animais (5%) com secreção nasal e 50 animais (25%) apresentavam-se bem debilitados. Em 60 animais (30%) observou-se infestação por pulgas.

Foram observadas mórulas em 19 esfregaços de sangue características de *Ehrlichia* sp. No entanto, somente 6 amostras de soro desses esfregaços foram sorologicamente positivas para *E. canis*.

5.2 Sorologia

5.2.1 Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

5.2.1.1 Soropositividade para *Ehrlichia canis*

O número de animais sororreagentes frente ao antígeno de *E. canis* foi de 11, correspondendo a um percentual de 5,5% da amostragem total de soros (n=200) de felinos analisados.

Os títulos de anticorpos variaram de 1:64 a 1:512. Dos 11 felídeos soropositivos, três apresentaram títulos 1:64; sete, 1:128 e um 1:512 (Figura 02).

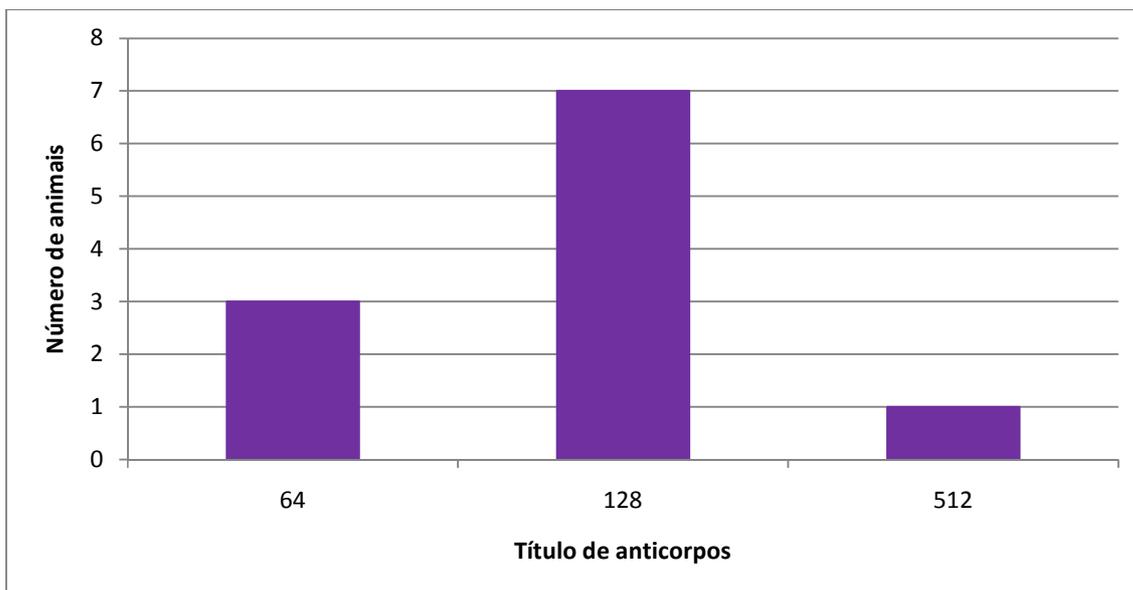


Figura 02. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em soros de gatos (n=200), colhidos na cidade de São Luís-MA, no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.

5.2.1.2 Soropositividade para *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

Das 200 amostras de soro de felídeos domésticos avaliadas, os títulos de anticorpos anti-*B. canis* variaram de 1:40 a 1:160. Dos cinco (2,5%) animais soropositivos, três apresentaram títulos de anticorpos 1:40 e dois animais 1:160 (Figura 03).

O número de animais sororreagentes para o antígeno de *T. gondii* foi de 101(50,5%) dentre as 200 amostras sob estudo. Os títulos de anticorpos variaram de 1:40 a 1:2560. Dos 101 animais sororreagentes, 27 apresentaram títulos de anticorpos de 1:40, 13 de 1:80, 22 de 1:160, 12 de 1:320, 13 de 1:640, 13 de 1:1280 e 1 de 1:2560 (Figura 04) e 99 (49,5%) amostras negativas.

O número de animais sororreagentes frente ao antígeno de *N. caninum* foi de 49 (24,5%) amostras dentre os 200 soros avaliados e 151 negativos (75,5%). Os títulos de anticorpos variaram de 1:25 a 1:400. Das 49 amostras soropositivas, 25

apresentaram títulos de anticorpos de 1:25, 19 de 1:50, 3 de 1:100 e 2 de 1:400 (Figura 05).

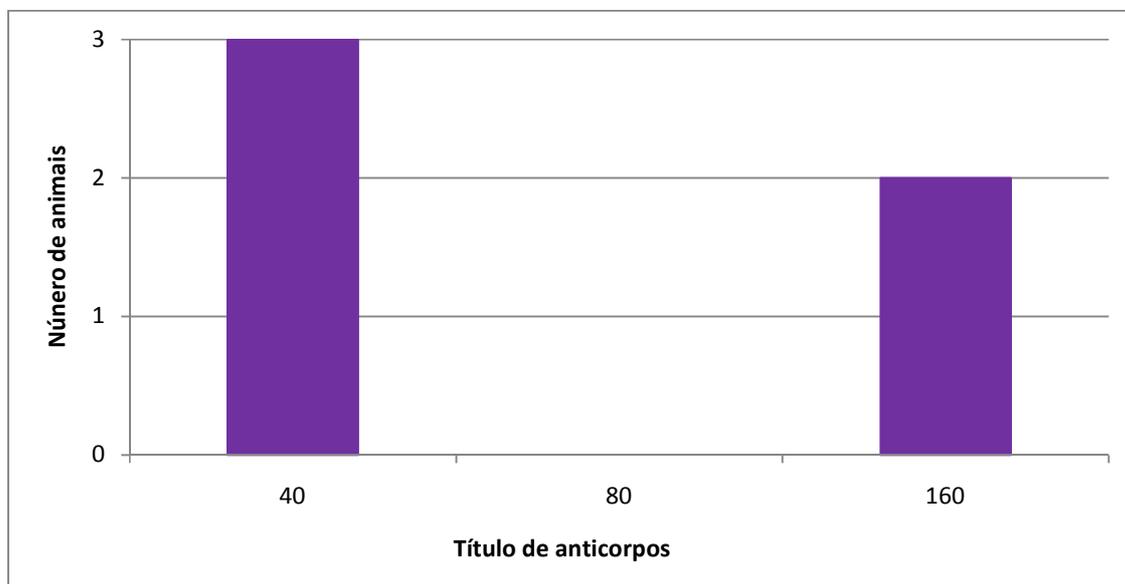


Figura 03. Frequência de anticorpos anti- *Babesia canis* em soros de gatos (n=200), colhidos na cidade de São Luís-MA, no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.

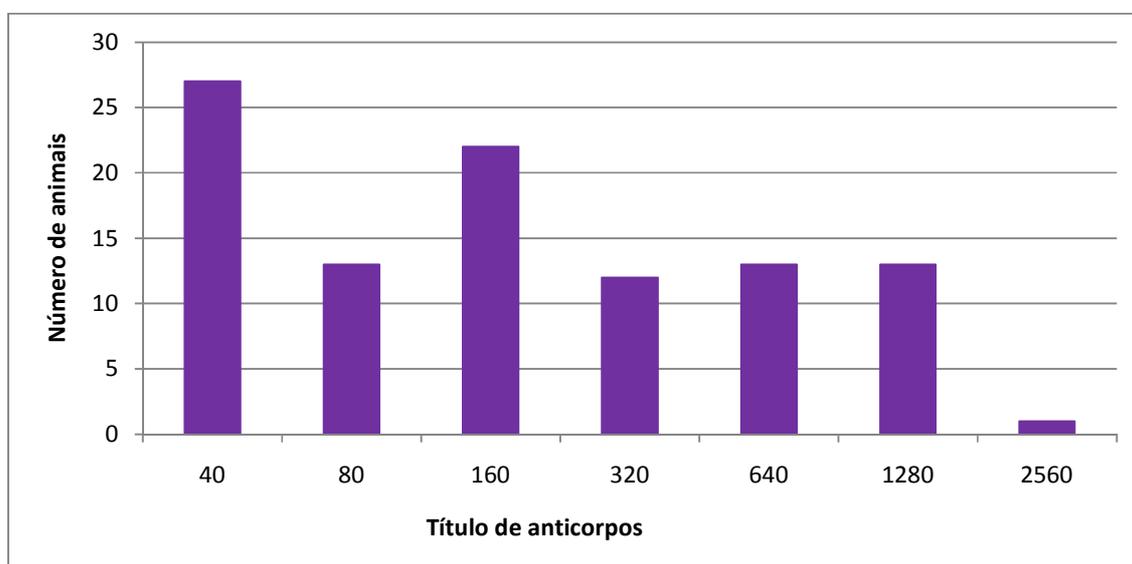


Figura 04. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de gatos (n=200), colhidos na cidade de São Luís-MA, no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.

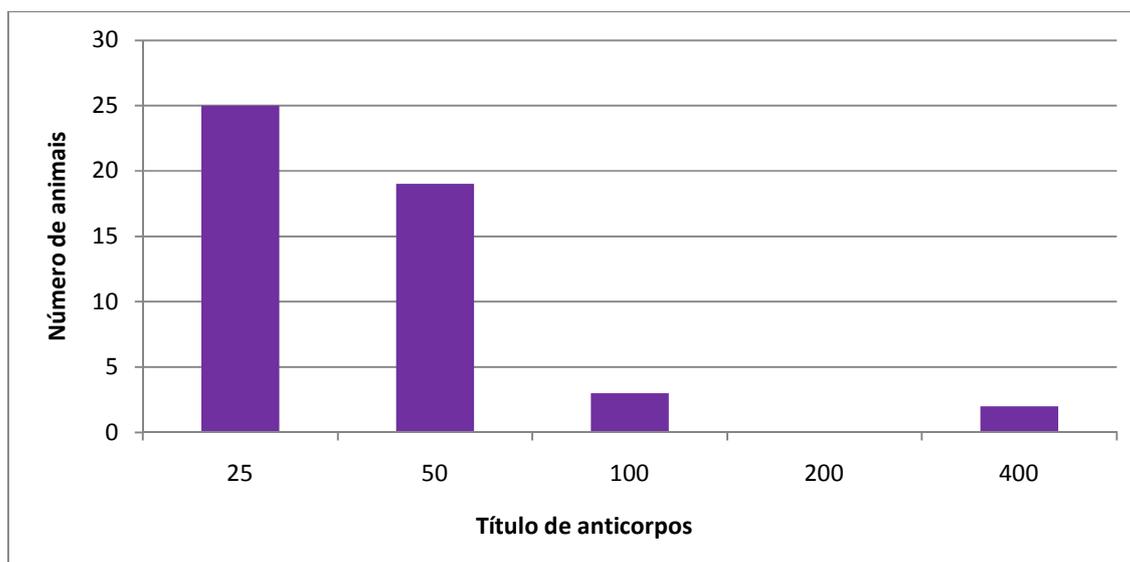


Figura 05. Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em soros de gatos (n=200), colhidos na cidade de São Luís-MA, no período de outubro de 2008 a janeiro de 2009.

5.2.1.3. Co-reatividade para *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*

Dentre os 200 soros dos animais amostrados, um (0,5%) soro foi positivo para *E. canis* e para *B. canis*, e 185 (92,5%) soros foram negativos para *E. canis* e para *B. canis*. (Tabela 01).

Tabela 01 Co-soropositividade e co-soronegatividade de soros de felídeos amostrados frente aos antígenos de *E. canis* e *B. canis*.

	Soropositivos <i>B. canis</i>	Soronegativos <i>B. canis</i>	Total
Soropositivos <i>E. canis</i>	1	10	11
Soronegativos <i>E. canis</i>	4	185	189
Total	5	195	200

5.2.1.4. Co-soropositividade e co-soronegatividade para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*

Dos 200 soros de animais estudados, 27 (13,5%) soros foram soropositivos para os antígenos de *N. caninum* e *T. gondii* e 77 (38,5%) soros não foram reagentes para nenhum dos dois agentes (Tabela 02).

Tabela 02. Co-soropositividade e co-soronegatividade de soros amostrados frente aos antígenos de *N. caninum* e *T. gondii*.

	Soropositivos <i>T. gondii</i>	Soronegativos <i>T. gondii</i>	Total
Soropositivos <i>N. caninum</i>	27	22	49
Soronegativos <i>N. caninum</i>	74	77	151
Total	101	99	200

5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

5.3.1 PCR para *E. canis* e *E. chaffeensis*

Das amostras (n=200) submetidas à Reação em PCR, duas (1%) foram positivas, uma (0,5%) foi positiva para *E. canis* (Tabela 03 e Figura 06) e a segunda amostra foi positiva para *E. chaffeensis* (Tabela 04 e Figura 07). Esta é a primeira vez que se detecta DNA de *E. chaffeensis* com base no gene 16S do rRNA ribossomal, em gatos domésticos.

Das duas amostras positivas para *Ehrlichia* sp. pela PCR com primers ECC e ECB, uma foi positiva para *Ehrlichia canis*, mas sorologicamente negativa pela RIFI. Entretanto, a segunda amostra positiva pela PCR para *E. chaffeensis* foi sorologicamente positiva pela RIFI.

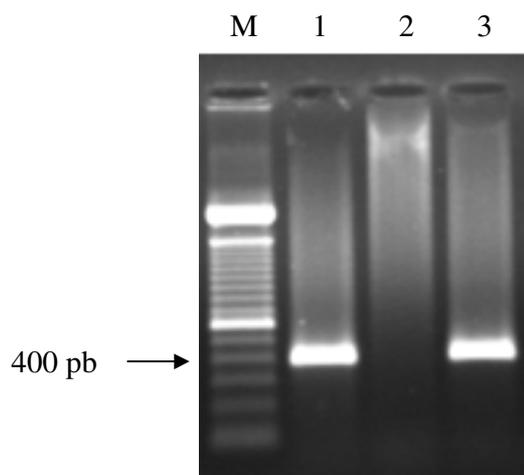


Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *E. canis* de acordo com a sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaleta 2: amostra de gato doméstico negativa (211); Canaleta 3: amostra de gato doméstico positiva (n° 45) para *E. canis* pela *Nested* PCR HE-3/ ECAN - 5.

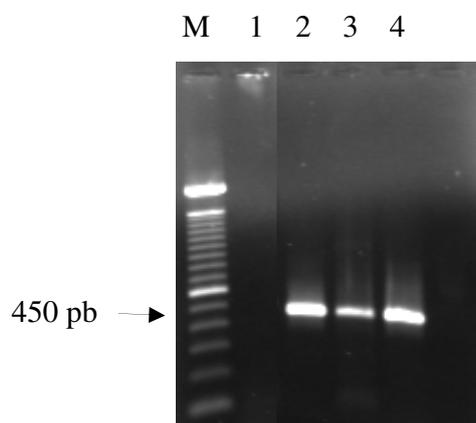


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *E. chaffeensis* de acordo com a sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle negativo (água pura estéril); Canaleta 2: controle positivo; Canaletas 3 e 4: amostras (n° 211) de gato doméstico positiva para *E. chaffeensis* pela *Nested* PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores CHAFF/GAIUR.

5.3.2 PCR para o gênero *Ehrlichia* sp. baseada nos genes Omp-1, dsb, GroESL e citrato-sintase

Das 200 amostras, duas foram positivas pela PCR de *Ehrlichia* sp., utilizando-se o gene 16S rRNA, dsb, groESL, citrato-sintetase, e Omp tiveram resultados negativos para o gênero *Ehrlichia*.

5.3.3 PCR para *Cytauxzoon*

As amostras soropositivas para *B. canis* (n=5) foram negativas pela PCR para os genes *Cytauxzoon* e *Babesia canis vogeli*.

5.3.4 PCR para *Mycoplasma* sp.

Das 200 amostras utilizadas para realização da PCR, utilizando-se o gene 16S rDNA, 4 amostras foram positivas para '*Candidatus M. turicensis*' (Tabela 03 e Figura 08), 20 amostras foram positivas para '*Candidatus M. haemominutum*' (Tabela 03 e Figura 09) e cinco amostras foram positivas para *M. haemofelis* (Tabela 03 e Figura 10), cinco amostras foram positivas tanto para *M. haemofelis* quanto para '*Candidatus M. haemominutum*' e nenhuma amostra foi positiva para *M. haemofelis* e '*Candidatus M. turicensis*', concomitantemente.

Tabela 03. Distribuição numérica de produtos da PCR positivos (n=29) por espécie dentro do gênero *Mycoplasma* spp. em gatos domésticos (n=200) de São Luís – MA.

Agente	Nº de Positivos
<i>Mycoplasma haemofelis</i> (Mhf)	5
<i>Mycoplasma haemominutum</i> (CMhm)	20
<i>Mycoplasma turicensis</i> (Mt)	4
Mhf + CMhm	5
Mhf + Mt	0

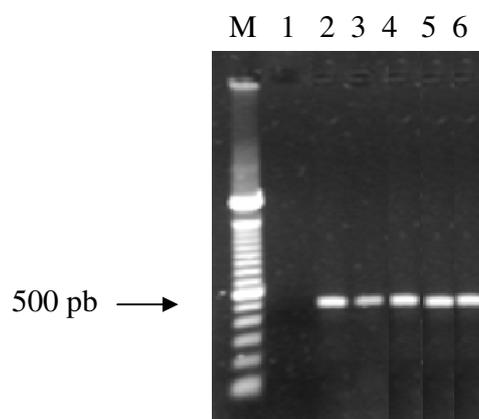


Figura 08. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros de 500 pb mostrados na foto são relativos à PCR para '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle negativo; Canaletas 2, 3, 4 e 5: amostras de gatos domésticos positivas; Canaleta 6: controle positivo.

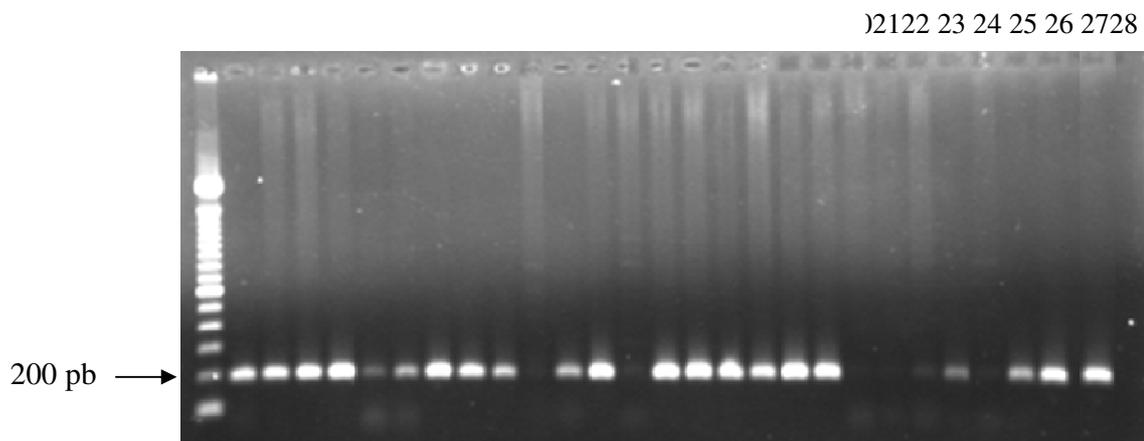


Figura 09. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros 200 pb mostrados na foto são relativos à PCR para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 25 e 26: amostras de gatos domésticos positivas; Canaleta 27: controle positivo; Canaleta: 28 controle negativo.

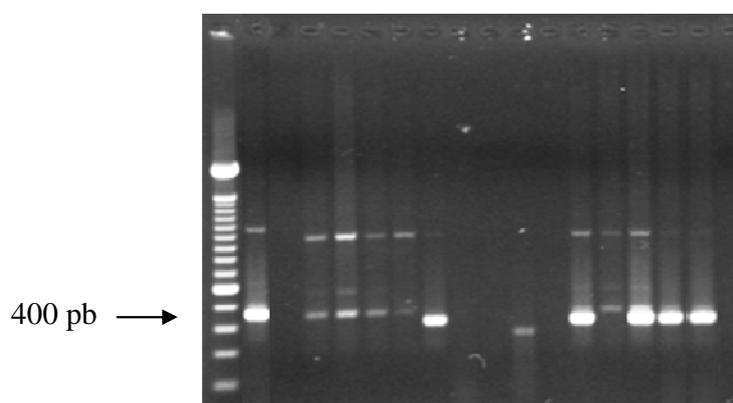


Figura 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros 400pb mostrados na foto são relativos à PCR para *Mycoplasma haemofelis*, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores baseados na sequência parcial do gene 16S rRNA. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 7, 12, 14, 15 e 16: amostras positivas de gatos domésticos na nPCR para o gene 16S rRNA; Canaleta 17: controle negativo.

5.4 Análise das similaridades de sequências pelo BLAST e Mega

O programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi utilizado para alinhar as sequências de interesse analisadas com dados existentes publicados no GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>) (BENSON et al., 2002), e assim verificar similaridades entre as sequências.

Os amplicímeros produzidos pelos oligonucleotídeos iniciadores (HE3/ ECAN) do gene 16S rRNA foram sequenciados das amostras positivas para *Ehrlichia* sp e apenas duas amostras foram positivas. Houve identidade de 97% entre o DNA de *E. canis* amplificado de gatos deste trabalho para *E. canis* Tunísia (EU781695, EU781694, EU781693), do Brasil (EF195135), com o Japão (AB454074), com a Tailândia (EU263991) e Taiwan (DQ228503) (Tabela 04).

Os amplicons sequenciados da amostra de DNA de *Ehrlichia* sp, apresentou 97% de identidade com *E. chaffeensis*, para as amostras dos Estados Unidos da América (EUA) (AF416764, CP000236, U60476, U86665), China (AF147752) e Argentina (EU826516 e EU826517) (Tabela 04).

Tabela 04. Comparação da homologia entre as sequências dos amplicímeros obtidos na PCR com os oligos ECAN/HE3 de fragmento do gene 16S rRNA para *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* (família Anaplasmataceae) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST (eValue=0).

Amostras São Luís - MA	Número de Acesso / % identidade						
	EU	EU	EU	EF	AB	EU	DQ
<i>Ehrlichia canis</i>	781695 Tunísia 97%	781694 Tunísia 97%	781693 Tunísia 97%	195135 Brasil 97%	454074 Japão 97%	263991 Tailândia 97%	228503 Taiwan 97%
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	AF 416764 EUA 97%	CP 000236 EUA 97%	U 60476 EUA 97%	U 86665 EUA 97%	AF 147752 China 97%	EU 826516 Argentina 97%	EU 826517 Argentina 97%

Com base nas sequências analisadas e comparadas de *E. canis* e *E. chaffeensis*, foi construída a árvore filogenética para as duas espécies (Figura 11). Também, para as sequências estudadas e comparadas dentro do gênero *Mycoplasma* e espécies *M. haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum* e *Candidatus M. turicensis* (Tabela 05), foi construída a árvore filogenética, que pode ser vista na Figura 12.

Tabela 05. Comparação da homologia entre sequências dos amplicoros obtidos na PCR com os oligos 1183F e 1290R; Hfelis-fl e Hfelis-r3 e Cali-F e Cali-R de ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *Mycoplasma haemofelis*, respectivamente, com amostras depositadas no GenBank e respectivos valores percentuais de identidade.

Amostras São Luís - MA	Número de Acesso / % identificada				
‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’	EU839977 Itália 99%	EU861063 Porto Alegre 99%	DQ825450 Brasil 99%	DQ464420 Reino Unido 99%	EU789559 Tailândia 99%
‘ <i>Candidatus Mycoplasma Haemominutum</i> ’	AM691834 China 97%	U88564 EUA 97%	AY150981 Reino Unido 97%	AY150987 Austrália 97%	DQ157147 Suíça 97%
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	AF178677 Oklahoma 98%	U88563 EUA 98%	AY150977 Austrália 98%	EU145745 Tailândia 98%	EU442639 Brasil 98%

Filogenia para *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis*

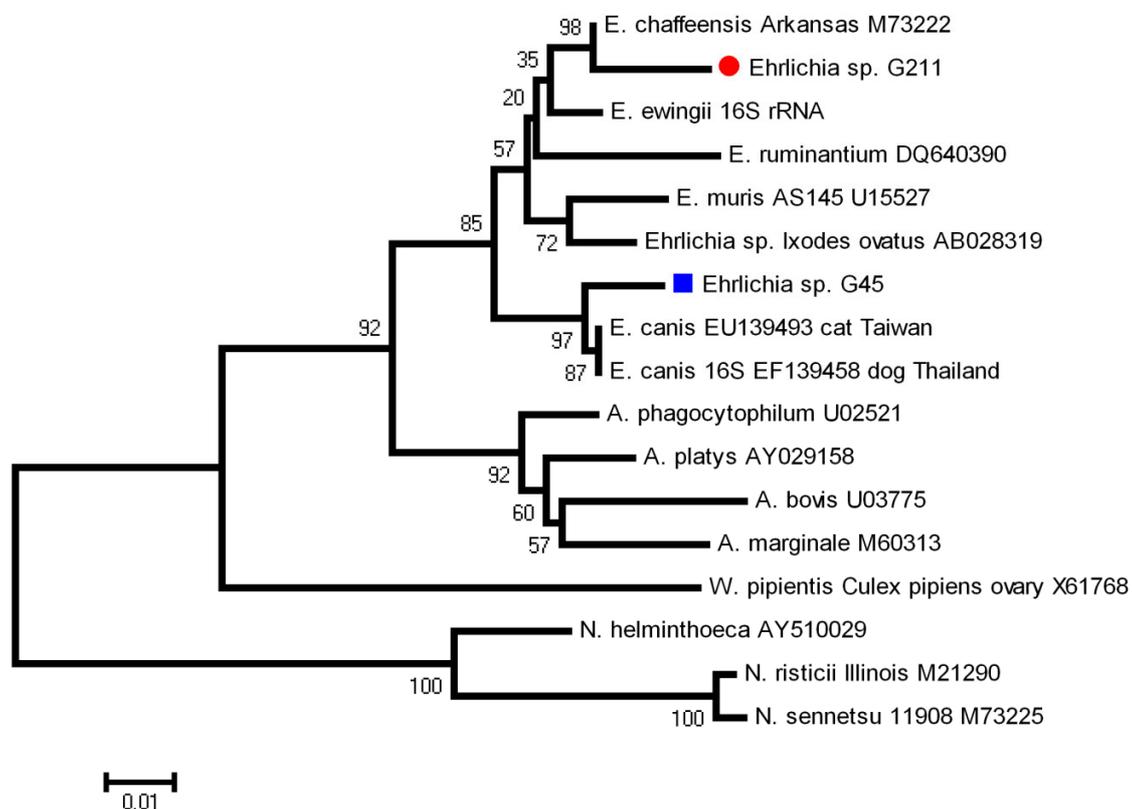


Figura 11. Dendrograma Filogenético exibindo as amostras positivas para a família Anaplasmataceae: gênero e espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* obtidas com sequências parciais do gene 16S rRNA (5' – 3') de sangue de gatos domésticos, naturalmente infectados na cidade de São Luís - Maranhão, Brasil. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com Bootstrap" de 1.000 repetições.

**Filogenia Para *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’
‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’.**

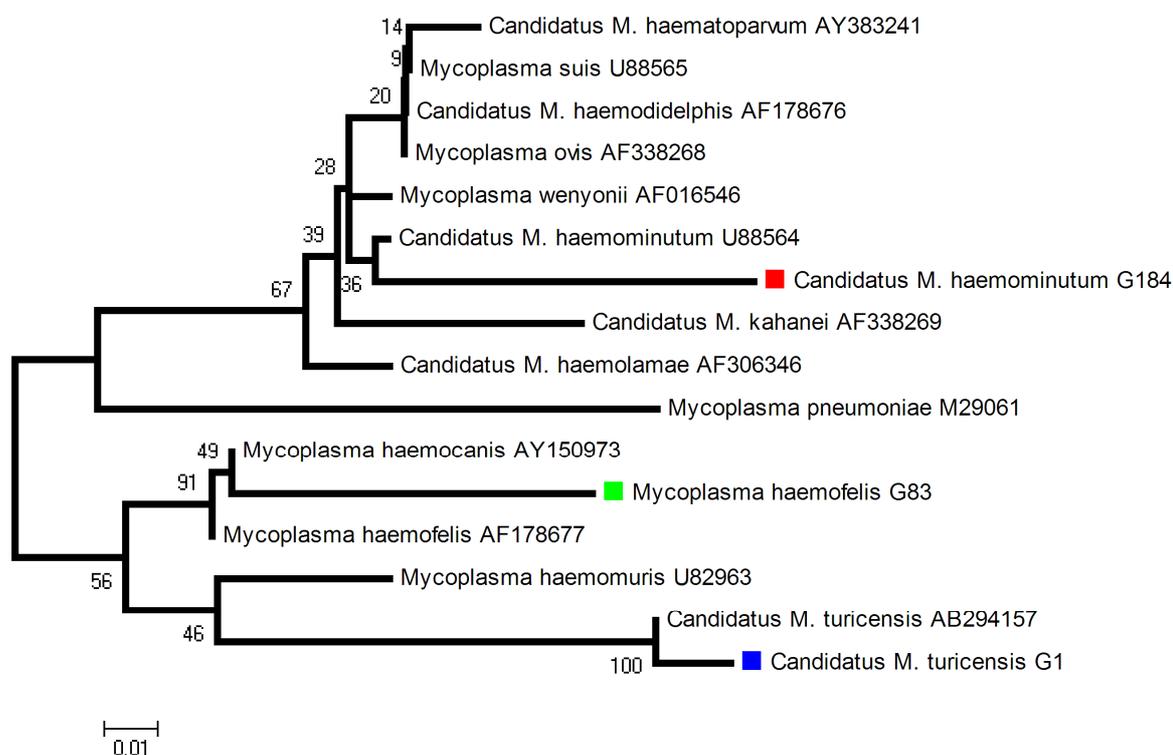


Figura 12. Dendrograma Filogenético exibindo as amostras positivas para a ordem R gênero e espécies ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *Mycoplasma haemofelis*, obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5’ – 3’) de sangue de gatos domésticos naturalmente infectados, na cidade de São Luís - Maranhão, Brasil. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com Bootstrap” de 1.000 repetições.

6. DISCUSSÃO

Erliquiose é uma doença de distribuição mundial associada a riquetsias. É transmitida por carrapatos, capazes de ocasionar doença em humanos e em diversas espécies de animais domésticos e selvagens. A erliquiose felina tem sido descrita em gatos que apresentam anemia, apatia, febre e presença de mórulas de *Ehrlichia* sp. em esfregaços sanguíneos, mostrando a necessidade de incluí-la no diagnóstico diferencial das infecções determinantes de anemia; entretanto a patogenicidade, via de transmissão e epidemiologia de *E. canis* em gatos domésticos ainda não está completamente elucidada. Neste estudo, foi observada a presença de *R. sanguineus* em apenas um animal, sendo a presença de pulgas mais frequente nos gatos estudados. A grande maioria dos gatos da cidade de São Luís do Maranhão eram peridomiciliados de áreas de invasões, nas quais a extensão de mata foi reduzida em aproximadamente 70%. Além do mais, esses animais frequentam as áreas restantes de mata, caçam ratos e são conviventes com canídeos. No município de Mossoró-RN, Brasil, FERREIRA et al. (2009) mostraram que em uma amostra de 62 gatos, a ocorrência de *Ctenocephalides felis* foi de 11,3% e *R. sanguineus* em 3,22% dos animais. Também CASTRO & RAFAEL, (2006), verificaram a presença de *C. felis* em 11 gatos de diferentes bairros na cidade de Manaus. A presença de *Amblyomma triste* em um gato doméstico foi registrada no Rio Grande do Sul (SILVA et al. 2007). Mais recentemente, STALLIVIERE et al. (2009), em Lages-SC pesquisaram ectoparasitas em gatos domésticos domiciliados nas regiões centrais e periféricas da cidade, encontrando a presença de ectoparasitas em 13,8%. As espécies mais identificadas foram *Ctenocephalides felis felis*, *C. canis* e *Ctenocephalides hibrido* (*C. felis felis* x *C. canis*).

Sinais clínicos, como palidez de mucosas, secreção ocular e nasal e debilidade foram evidenciados nos gatos sob estudo. Entretanto, esses sinais clínicos não podem ser associados às doenças diagnosticadas neste trabalho, pois não são específicos ou patognomônicos de erliquiose, babesiose, toxoplasmose, neosporose e micoplasmose em felinos domésticos. Alguns dos sinais clínicos

descritos foram relatados por vários pesquisadores na erliquiose felina (BUORO et al. 1989; BUORO et al. 1994; BOULOY et al. 1994; ALMOSNY & MASSARD, 1999; BREITSCHWERDT et al. 2002). É importante ressaltar que neste trabalho também foi possível verificar a presença de mórulas características de *Ehrlichia* sp. em esfregaços sanguíneos corados, mas não houve correlação entre o número de diagnóstico direto positivo com a detecção de anticorpos anti- *E. canis* nas mesmas amostras. Estruturas intra e extracelulares, como plaquetas, material nuclear fagocitário em monócitos, grânulos azurófilos em linfócitos podem ser confundidos com mórulas de *Ehrlichia* sp. pois o número de células parasitadas é pequeno e dependente da experiência do microscopista (MYLONAKIS et al. 2003). Dessa forma, o diagnóstico direto de *Ehrlichia* sp. em esfregaços sanguíneos é difícil e pode sofrer interferência de outras doenças infecto-parasitárias, as quais apresentam semelhanças de sinais clínicos e presença de corpúsculos de inclusão em células brancas.

A frequência de sororreatividade dos gatos deste trabalho frente ao antígenos de *E. canis* foi pequena, e os títulos de anticorpos baixos. Embora os testes sorológicos sejam os mais utilizados no diagnóstico de erliquiose canina e felina, resultados falso-negativos podem ocorrer nas infecções precoces dos animais (WALKER et al. 1996, WANER et al. 2001; PADDOCK & CHILDS, 2003). Também não é possível estabelecer, pela sorologia, o diagnóstico específico dentre as espécies do gênero *Ehrlichia*, pois apresentam antígenos comuns, e a reatividade cruzada comumente ocorre (WALKER et al. 1996; WANER et al. 2001; PADDOCK & CHILDS, 2003). Dos 200 gatos amostrados, onze (5,5%) apresentaram anticorpos anti-*E. canis* com títulos variando de 1:64 a 1:2560, diferentes daqueles encontrados por diversos pesquisadores, que variou de 82,4% (BOULOY et al. 1994), 12% (MATTHEWMAN et al. 1996), 13,2% (STUBBS et al. 2000), 2,4% (AGUIRRE et al. 2004), 17,9% (ORTUÑO et al. 2005), 0,98% (VITA et al. 2005), 11,3% (SOLANO-GALLEGO et al. 2006) e 25% (ANDRÉ et al. 2009). Entretanto, altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* foram detectados em um puma (*Puma concolor*) pela primeira vez no Brasil (FILONI et al. 2006).

Neste estudo, a detecção de anticorpos anti- *B. canis* foi pequena, sendo cinco (2,5%) felídeos soropositivos, e os títulos de anticorpos variaram de 1:40 a 1:160. Poucos são os estudos realizados em felídeos domésticos com o objetivo de diagnosticar a babesiose. Além disto, a babesiose felina não está associada à febre, icterícia, trombocitopenia e lesão renal (FUTTER et. al. 1981; SCHOEMAN et. al. 2001; PENZHORN et. al. 2006b). No Brasil, em uma colônia urbana de gatos (*Felis catus*) de um zoológico do Rio de Janeiro foi observada a presença de piroplasmas em 47% dos animais, entretanto, estes hemoparasitas eram indistinguíveis entre *Cytauxzoon* spp. e *Babesia* spp. (MENDES-DE-ALMEIDA et al. 2004). Piroplasmas intraeritrocitários em gatos brasileiros foram observados por GAZETA et al. (2004) e DANTAS-TORRES & FIGUEREDO (2006). Tais resultados diferem dos encontrados por ANDRÉ et al. (2009) que, trabalhando com felídeos selvagens, observaram menor sororreatividades para *E. canis* do que para *B. canis*.

Cytauxzoon felis é transmitido por carrapatos heteroxenos da espécie *Dermacentor variabilis* nos Estados Unidos (QUINN et al., 1997), mas este ainda é o único carrapato incriminado como vetor da cytauxzoonose (GREENE, 2006), embora, no Brasil, o vetor dessa doença não foi determinado (SOARES, 2001) e outras espécies de carrapatos como o *Amblyomma americanum* (BONDY et al. 2005), possam estar envolvidas. O lince e outros felídeos selvagens servem como hospedeiros naturais, e o gato doméstico é provavelmente um hospedeiro acidental (QUINN et al. 1997), pois nele a doença é rapidamente progressiva e fatal. As formas intraeritrocitárias de *C. felis* podem ser confundidas com *Babesia felis*, diferenciando-se os dois parasitos pelo ciclo tecidual e sanguíneo em *Cytauxzoon* sp., enquanto *Babesia* sp. só faz ciclo sangüíneo (HOOVER et al.1994). Entretanto, não foi molecularmente diagnosticado *Cytauxzoon* nas amostras de sangue dos gatos sob estudo e lembrando que somente em um gato foi encontrado o carrapato *R. sanguineus*, e em nenhum dos animais soropositivos para *B. canis*. A quase ausência de carrapatos na população de gatos estudada indica a não-presença de *Cytauxzoon*, sendo importante ressaltar que reações sorológicas cruzadas entre *C. felis* e *B. canis* podem ocorrer. Vale ressaltar que a soropositividade para *Babesia canis* foi baixa e que outros meios de transmissão devem ser investigados nos

felídeos domésticos. A coinfeção entre *E. canis* e *B. canis* foi baixa, no entanto são poucos os trabalhos que fazem esse tipo de estudo. Das 200 amostras, 92,5% dos soros (n=185) foram conegativos para os dois hemoparasitas. Não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que demonstrem a co-soropositividade em felídeos domésticos para esses agentes. Neste trabalho, em nenhuma amostra soropositiva frente ao antígeno de *B. canis* foi possível amplificar o DNA de *C. felis* e nem de *B. canis*.

A sororreatividade dos gatos frente ao antígeno de *Toxoplasma gondii*, neste trabalho foi expressiva e correspondente a 50,5% da amostra estudada, com títulos de anticorpos variando de 1:40 a 1:2560. Em geral, a soroprevalência para *T. gondii* em gatos é alta, depende da região, idade dos animais, da área urbana ou rural, da fonte de alimentação e ainda da sensibilidade da técnica sorológica empregada (MIRÓ et al. 2004; PENA et al. 2006; DUBEY et al. 2006; LOPES et al. 2008). A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos nos diferentes Estados do Brasil varia de 10,2% no Rio Grande do Sul a 90,3% no Amapá e Roraima (FIALHO et al. 2009). No presente estudo, a soroprevalência para *T. gondii* foi maior que aquelas encontrada pelos autores acima citados. Entretanto, a soropositividade para *N. caninum* nos gatos deste trabalho foi baixa. Na Itália, foi encontrada uma soroprevalência de 24,8% na diluição 1:80, 12% na diluição 1:60 e 53% na diluição 1:320 dentre 282 gatos (FERROGLIO et al. 2005). Outro trabalho realizado no Brasil, na região de Araçatuba, São Paulo, em uma amostra de 400 gatos, 100 gatos foram positivos para *T. gondii* e 98 gatos soropositivos para *N. caninum* (BRESCIANI et al. 2006). Na cidade de São Luís do Maranhão, este é o primeiro trabalho de detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em gatos domésticos. Mais estudos no Brasil são necessários para melhor esclarecimento do papel dos gatos domésticos na epidemiologia dessa doença. Gatos domésticos coinfectados com *T. gondii* e *N. caninum* tiveram contato com os dois agentes parasitários. A RIFI detecta anticorpos específicos (DUBEY et al. 2000) uma vez que esses animais foram positivos tanto para *T. gondii* como para *N. caninum*, significando a coinfeção. Hábitos dos gatos peridomiciliados permitem que freqüentem áreas de matas, capturando ratos, convivendo com os canídeos silvestres ali presentes e, portanto, possibilitando a

infecção natural. No entanto, no estudo soroepidemiológico para *T.gondii* e *N. caninum* pôde-se verificar pequeno número de sororreagentes. Já, BRESCIANI et al. (2006) verificaram co-positividade para *T. gondii* e *N. caninum* em 25% (n=40), percentual maior em relação àquele encontrado neste trabalho. Este resultado é interessante e merece ser investigado com maior frequência na população de felídeos domésticos em nosso País.

A presença de DNA de *Ehrlichia canis* foi detectada em 1 animal com o produto da PCR confirmado pelo sequenciamento genético, o qual mostrou similaridade com sequências de DNA depositadas no GenBank para *Ehrlichia canis*, de amostra da Tunísia, (números de acesso EU 781695, EU781694, EU781693), Brasil (EF195135), Japão (AB454074), Tailândia (EU263991) e Taiwan (DQ228503). Também, BREITSCHWERDT et al. (2002) detectaram DNA de *E. canis* em 3 felinos domésticos com manifestações clínicas da erliquiose, porém, soronegativos frente ao antígeno desse parasita. Ainda, YIN-CHIACHUN et al. (2003) detectaram DNA de *E. canis* pela *Nested* PCR em 2 (11,76%) dos felinos sororreagentes dentre os 17 analisados os quais apresentavam-se soronegativos e anêmicos. Outro trabalho realizado por TABAR et al. (2007), em Barcelona, demonstrou um animal positivo pela PCR para os gêneros *Ehrlichia/Anaplasma* em 100 felinos domésticos estudados. Além do mais, DNA de *Anaplasma phagocytophilum* já foi detectado em felinos domésticos (BJOERSDORFF et al. 1999; LAPPIN et al. 2004). Na cidade de São Luís, no Estado do Maranhão, não foram encontrados na literatura consultada, estudos que demonstrem se a erliquiose canina e felina possa ser endêmica. O presente trabalho mostrou uma baixa incidência desse parasita em felinos domésticos. Os resultados deste estudo discordam dos achados de LURIA et al. (2004), os quais não detectaram DNA de *Ehrlichia* spp. em amostras de 553 felinos domésticos da Flórida, pela PCR. Da mesma forma, de uma amostra de 92 felinos domésticos do Alabama, Maryland e Texas, LAPPIN et al. (2005) também não detectaram DNA erliquial. Ainda, EBERHARDT et al. (2006) não obtiveram positividade para felinos domésticos no Arizona pela PCR para *E. canis*. Considerando que as três regiões de estudo norte-americano sejam endêmicas para a infecção por *E. canis* em cães, os autores acima citados sugerem que felinos

são mais resistentes a infecções ou menos expostos a vetores apropriados para cães ou, ainda, removem os vetores antes que a transmissão dos hemoparasitas ocorra, uma vez que é necessário um período mínimo de 24-48 horas para o processo de transmissão. Também é provável que felinos possuam baixa parasitemia e menor número de cópias de DNA de *E.canis* que os cães, gerando resultados falso-negativos (LURIA et al. 2004; LAPPIN et al. 2005; EBERHARDT et al. 2006). De acordo com SHAW et al. (2001), felinos parecem ser menos predispostos que cães a certas doenças transmitidas por carrapatos, tais como: erliquioses, babesioses e hepatozoonoses. Para ISHAK et al. (2006), essas infecções são raras e geograficamente definidas. A natureza não específica dos sinais clínicos de erliquiose felina possam resultar em subdiagnóstico. Além do mais, a associação da doença com infestação por carrapatos pode ser menos evidente em felinos de pelo longo ou quando os felinos não são examinados atenciosamente quanto à presença destes ectoparasitas (SHAW et al. 2001). A sensibilidade da PCR na identificação de agentes erliquiais nos felinos com infecção crônica é desconhecida, os microrganismos erliquiais podem ser sequestrados no baço e não serem encontrados no sangue circulante. Uma vez que a infecção em felinos mimetiza a erliquiose canina, pode existir grande número de felinos com infecção subclínica. A sorologia auxilia na detecção dos felinos em fase subclínica, entretanto, falsos positivos podem ocorrer no caso em que o animal for tratado, mas mantém títulos altos de anticorpos circulantes. Assim, os felinos assintomáticos, em fase subclínica, podem ser identificados pela sorologia (LEGENDRE et al. 2002; BILLETTER et al. 2007). De outra forma, os felinos podem ter debelado o parasita, porém mantêm os títulos de anticorpos em níveis ainda detectáveis (BILLETTER et al. 2007).

O DNA de *Ehrlichia chaffeensis* foi detectado também em um gato, neste estudo, confirmado pelo sequenciamento genético, pois o produto da PCR amplificado, mostrou identidade com sequência de DNA do gene 16S rRNA de *E. chaffeensis* de cães dos EUA (números de acesso AF416764, CP000236, U86665), China (AF147752) e Argentina (EU826516, EU826517). Este resultado é inédito no Brasil, não sendo encontrado na literatura consultada resultados similares em felídeos domésticos. A erliquiose humana recebe especial atenção como um

problema de saúde pública, podendo ser causada por *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *N. sennetsu*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* (WALKER & DUMLER, 1996; DUMLER et al. 2001; UNVER et al. 2001; PADDOCK & CHILDS, 2003; TAMÍ & TAMÍ-MAURY, 2004; PAROLA et al. 2005; WORMSER et al. 2006).

No Brasil, a primeira caracterização molecular de *Ehrlichia chaffeensis* foi detectada em amostras de sangue de cervos (*Blastocerus dichotomus*) capturados nos pântanos do rio Paraná, no Sudeste do Brasil, em 1998. As amostras de sangue foram analisadas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e *Nested* PCR. O cervo do pantanal pode ser um reservatório natural do agente que causa a erliquiose monocítica humana. (MACHADO et al. 2006). Os primeiros casos suspeitos de erliquiose humana foram descritos no Estado de Minas Gerais, pela sintomatologia clínica compatível com a infecção por *E. chaffeensis* (CALIC et al. 2004; COSTA et al. 2005; COSTA et al. 2006). *Ehrlichia chaffeensis* causa a erliquiose monocítica humana e, portanto, o parasita demonstra ser importante pelo seu potencial zoonótico. No entanto, reação sorológica cruzada é comum entre os antígenos de *E. canis* e *E. chaffeensis*.

Vale ressaltar que, dos 5 animais soropositivos frente ao antígeno de *B. canis*, nenhum foi positivo pela PCR. Entretanto, diferentes autores, demonstraram que felinos podem ser infectados com *B. canis presentii*, *B. canis canis*, *B. felis* e *B. leo* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; BANETH et al., 2004; PENZHORN et al., 2001; BOSMAN et al., 2006). Por meio da amplificação, sequenciamento e análises filogenéticas, usando-se os genes 18S rRNA e 5,8 S, BANETH et al. (2004) detectaram DNA de uma nova subespécie de *B. canis*, *B. canis subesp. presentii*, em dois felinos domésticos de Israel. Ainda, na Espanha, apresena de DNA de *B. canis canis* foi detectada em um felino doméstico com sintomatologia clínica de babesiose (CRIADO-FORNELIO et al., 2003). *Babesia felis* e *B. leo* ocorrem como infecoes únicas ou coinfecoes em várias espécies de felídeos da África do Sul, porém, mais frequentemente em felinos domésticos e lees, respectivamente (LOPEZ-REBOLLAR et al. 1999; PENZHORN et al. 2001; PENZHORN et al. 2006; BOSMAN et al. 2006).

Presença de DNA de '*Candidatus mycoplasma turicensis*', '*Candidatus mycoplasma haemominutum*' e *Mycoplasma haemofelis* foi demonstrada no sangue dos gatos deste trabalho, assim como de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'. Pelo sequenciamento genético, o produto de DNA amplificado de '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' mostrou identidade com sequências depositadas no Genbank com base no gene 16S rRNA de '*Candidatus Mycoplasma turicensis*, de amostras da Itália (EU839977), Porto Alegre (número de acesso EU861063), Brasil (DQ825450), Reino Unido (DQ464420) e Tailândia (EU789559). Nesse trabalho, a prevalência por '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' foi menor do que a encontrada por SANTOS et al. (2009), entretanto, maior que a prevalência observada por HORA, (2008). Pelo sequenciamento genético, o produto amplificado de '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' deste estudo mostrou identidade do gene 16S rRNA de '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' da China (número de acesso AM691834), EUA (número de acesso U88564), Reino Unido (AY150981), Austrália (AY150987) e Suíça (DQ157147). No presente estudo, a prevalência foi similar às encontradas por diferentes pesquisadores (BAUMANN et al. 2006; BATISTA et al. 2004; MACIEIRA et al. 2008; MACIEIRA et al. 2009), entretanto menor que aquelas encontradas por SANTOS et al. (2009). O produto de DNA amplificado, com base na sequência do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemofelis*, mostrou similaridade com amostras de *Mycoplasma haemofelis* de Oklahoma (AF178677), EUA (U88563), Austrália (AY150977), Tailândia (EU145745) e Brasil (EU442639). A prevalência foi menor que aquelas encontradas em felinos domésticos na literatura (BAUMANN et al. 2006; SANTOS et al. 2009; HORA, 2008; BATISTA, 2004; MACIEIRA et al. 2008; MACIEIRA et al. 2009).

No Brasil, a primeira caracterização molecular de coinfeção com *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' foi realizada por MORAIS et al, (2007), em três gatos domésticos. Neste estudo, foi demonstrado coinfeção pelo *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' pela PCR no sangue de 2,5% dos gatos. Muitas doenças infectoparasitárias são transmitidas por espécies de artrópodes, entre esses estão os carrapatos e pulgas que atuam não só

como vetores de doenças transmissíveis mas também como hospedeiros intermediários. A pulga *Ctenocephalides felis* comumente ingere *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (WOODS et al. 2005; LAPPIN et al. 2006), pulga comum em gatos no Brasil, (PEREIRA & SANTOS, 1998). Em regiões tropicais, a prevalência de micoplasmas hemotróficos é alta em razão das condições ambientais, favorecendo, desse modo, a transmissão desses parasitas, pelos vetores (MACIEIRA, et. al, 2008; MACIEIRA et. al, 2009). Dados de hemoplasmoses em gatos domésticos peridomiciliados na cidade de São Luís do Maranhão são inéditos e de grande contribuição científica. Os resultados deste estudo corroboram os resultados de outros trabalhos, em que também foi detectada baixa coinfeção para os mesmos parasitas (JENSEN et al. 2001; BATISTA et al. 2004; BAUMANN et al. 2006; EBERHARDT et al. 2006; MORAIS et al. 2007; MACIEIRA et al. 2008; MACIEIRA et al. 2009). Dentre os hemoplasmas que infectam felídeos domésticos, os mais relatados como causadores de coinfeção foram *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (JENSEN et al. 2001; BATISTA et al. 2004; BAUMANN et al. 2006; EBERHARDT et al. 2006; MORAIS et al. 2007; MACIEIRA et al. 2008; MACIEIRA et al. 2009). Vale ressaltar que, nestes estudos, a maior prevalência (10%) de hemoplasmas foi para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' sendo a espécie de menor patogenicidade que *Mycoplasma haemofelis* (FOLEY et al. 1998; JENSER et al. 2001; WESTFALL et al. 2001).

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Felinos de vida livre, residentes em áreas periféricas da cidade de São Luís, Maranhão, estão expostos aos agentes da erliquiose canina e humana, neosporose canina e toxoplasmose e podem representar um risco à saúde pública;
- Felinos domésticos da cidade de São Luís do Maranhão são expostos à infecção por '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e *Mycoplasma haemofelis*;
- O sequenciamento do fragmento da PCR amplificado, baseada no gene 16S rRNA confirmou pela primeira vez a detecção de *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis*, em gatos domésticos, em São Luís do Maranhão.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Assessment of feline ehrlichiosis in Central Spain using serology and a polimerase chain reaction technique. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1026, p. 103-105, 2004.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose felina – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 23, p. 30-32, 1999.

ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: _____. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002. p. 14-56.

ALMOSNY, N. R. P.; ALMEIDA, L. E.; MOREIRA, N. M.; MASSARD, C. L. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K. F.; NAKAGHI, A. C. H.; DAGNONE, A. S. Molecular Detection of *Cytauxzoon* spp. in Asymptomatic Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 45, n. 1, p. 234-237, 2009.

BANETH, G.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; UG, Y.; SHKAP, V.; LEVY, A.; SHAW, S. E. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis subsp. presentii*, in domestic cats. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 99-105, 2004.

BATISTA, T. N. **Frequência de infecção do *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus*” *Mycoplasma hamominutum* em gatos.** 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

BAUMANN, A.; GUIMARÃES, A. M. S.; SILVAL, C. C.; YAMAGUTTI, M.; KOZAMJAKIM, D. A.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; TIMENETSKY, J. *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus* *Mycoplasma hamominutum*’ detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. **Veterinary Clinical Pathology**, Malden, v. 35, suppl., p. 370, 2006.

BEAUFILS, J. P.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P. *Ehrlichia* infection in cats: a review of three cases. **Pratique Medicale and Chirurgicale de l’Animal de Compagnie**, Paris, v. 30, n. 3, p. 397-402, 1995.

BEAUFILS, J. P.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.; BARBAULT-JUMELLE; M. Ehrlichiosis in cats. A retrospective study of 21 cases. **Pratique Medicale and Chirurgicale de l’Animal de Compagnie**, Paris, v. 34, n. 5, p. 587-596, 1999.

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

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 59, n. 10, p.1215-1220, 1998.

BILLETER, S. A.; SPENCER, J. A.; GRIFFIN, B.; DYKSTRA, C. D.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-2, p. 194-198, 2007.

BIRKENHEUER, A. J.; MARR, H.; ALLEMAN, A. R.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 144-149, 2006.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst- forming sporozoon causings encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 70, p. 271- 274, 1984.

BJÖERSDORFF, A.; SVENDENIUS, L.; OWENS, J. H.; MASSUNG, R. F. Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 20-24, 1999.

BOBADE, P. A.; NASH, A. S.; ROGERSON, P. Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. **Veterinary Record**, London, v. 122, n. 2, p. 32-36, 1988.

BONDY JR., P. J.; COHN, L. A.; TYLER, J. W.; MARSH, A. E. Polymerase chain reaction detection of *Cytauxzoon felis* from field-collected ticks and sequence analysis of the small subunit and internal transcribed spacer 1 region of the ribosomal RNA gene. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 2, p. 458-461, 2005.

BOOZER, A. L.; MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, Philadelphia, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.

BOSMAN, A. M.; VENTER, E. H.; PENZHORN, B. L. Occurrence of *Babesia felis* and *Babesia leo* in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 33-38, 2006.

BOULOY, R. P.; LAPPIN, M. R.; HOLLAND, C. H.; THRALL, M. A.; BAKER, D.; O'NEIL, S. Clinical ehrlichiosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 204, n. 9, p. 1475-1478, 1994.

BRANDÃO, V. M.; COSTA, F. B. da; SILVA, I. A. da; SILVA, D. F. da; DIAS, I. C. L.; GENNARI, M.; SOUZA, J. R. S. T. de; SILVA, M. I. Levantamento soroepidemiológico da Toxoplasmose em ovinos na ilha de São Luís-MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Disponível em: < <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7890/5731>>. Acesso em: 20 set. 2009a.

BRANDÃO, V. M.; COSTA, F. B. da; SILVA, I. A. da; SILVA, D. F. da; DIAS, I. C. L.; SOARES, J. G.; GENNARI, S. M.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, M. I. S. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e fatores de risco associados à infecção em caprinos da ilha de São Luís-MA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA., 8., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** supl. 1. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/7884/5719>>. Acesso em: 20 set. 2009b.

BREITSCHWERDT, E. B. Babesiosis. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 796-803.

BREITSCHWERDT, E. B.; ANTHONY, C. G.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; LAPPIN, M. R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S. I.; COWAN, S. M.; CLOOTEN, J. K.; HEGARTY, B. C.; HAWKINS, E. C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in

cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, n. 6, p. 642-649, 2002.

BRESCIANI, K. D. S.; GENNARI, S. M.; SERRANO, A. C. M.; RODRIGUES, A. A. R.; UENO, T.; FRANCO, L. G.; PERRI, S. H. V.; AMARANTE, A. F. T. Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 100, n. 2, p. 281-285, 2006.

BUORO, I. B. J.; ATWEL, R. B.; KIPTOON, J. C.; IHIGA, M. A. Feline anaemia associated with *Ehrlichia*-like bodies in three domestic short-haired cats. **Veterinary Record**, London, v. 17, n. 125, p. 434-436, 1989.

BUORO, I. B. J.; NYAMWANGE, S. N.; KIPTOON, J. C. Presence of *Ehrlichia*-like bodies in monocytes of adult lioness. **Feline Practice**, Santa Barbara, v. 1, n. 22, p. 36-37, 1994.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F. C. M. B. M.; LEITE, R.; WALKER, D. H. Human erliquis in Brazil: first suspect cases. **The Brazilian Journal of Infectious Disiases**, Salvador, v. 8, n. 3, p. 259-262, 2004.

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*: diferenciação dos três subespécie por uma restrição análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados em pequena subunidade ribossomal RNA genes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Malden, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CASTRO, M. C. M. de; RAFAEL, J. A. Ectoparasitos de cães e gatos da cidade de Manaus, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 4, p. 535-538, 2006.

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

CHARPENTIER, F.; GROULADE, P. Probable case of Ehrlichiosis in a cat. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, Paris, v. 3, n. 59, p. 287-290, 1986.

CHESSUM, B. S. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. **British Veterinary Journal**, London, v. 128, n. 7, p. 33-36, 1972.

CHILDS, J. E.; SEEGAR, W. S. Epidemiologic observations on infection with *Toxoplasma gondii* in three species of urban mammals from Baltimore, Maryland, USA. **International Journal of Zoonoses**, Taipei, v. 13, n. 4, p. 249- 261, 1986.

COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. C. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 853-859, 2005.

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

COTTER, S. M; HARDY JR, W. D; ESSEX, M. Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 166, n. 5, p. 449-454, 1975.

COUTO, C. G. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders**: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1998. p.139-142.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 93, n. 4, p. 307-317, 2003.

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

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: a brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006.

DAVIS, L. J. On a piroplasm of the Sudanese cat (*Felis ocreata*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 22, n. 6, p. 535-537, 1929.

DAWSON, J. E.; ABEYGUNAWARDENA, I.; HOLLAND, C. J.; BUESE, M. M.; RISTIC, M. Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 12, n. 49, p. 2096-2100, 1988.

DOMINGUES, L. M.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI COSTA, M.; MALHEIROS, E. R. Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma Gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (Elisa) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária / Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 79-85, 1998.

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

DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma Gondii* by chronically infected cats. **Nature**, London, v. 262, p. 213-214, 1976.

DUBEY, J. P. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cats. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 63, n. 1, p.156-157, 1977.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocytes by cats. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 64, n. 1-2, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J. P. History of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **The Journal of Eukariotic Microbiology**, Lawrence, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-40.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Extra-intestinal stages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. **The Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 19, n. 1, p. 89-92, 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 11, n. 4, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis from acutely infected and the development of *Toxoplasma* cysts. **The Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. **Parasitology Research**, Berlin, v. 86, p. 165-168, 2000.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D.; LAPPIN, M. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 39, n. 6, p. 1009-10034, 2009.

DUBEY, J. P.; SCHARES, C. D.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P.; SU, C.; CORTÉS, J. A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J. E.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South Africa and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 42-47, 2006.

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

EBERHARDT, J. M.; NEAL, K.; SHACKELFORD, T.; LAPPIN, M. R. Prevalence of infectious disease agents in cats from Arizona. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 3, p. 164-168, 2006.

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

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERREIRA, C. G. T.; BEZERRA, A. C. S.; FILGUEIRA, K. D.; FONSECA, A. A. de; AHID, S. M. M. Levantamento de ectoparasitas de cães e gatos provenientes do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. **PUBVET**, v. 3, n. 12, 2009. Disponível em: < <http://www.pubvet.com.br/download.asp?artigo=91>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

FERROGLIO, E.; MAROLI, M.; GASTALADO, S.; MIGNONE, W.; ROSSI, L. Canine leishmaniasis, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n. 10, p.1681-1620, 2005.

FIALHO C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p.1-24, 2009.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of feline herpesvírus, calicivírus, parvovírus, and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 2, p. 470-477, 2006.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. '*Candidatus* Mycoplasma aemominutum', a low-virulence epierythrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Basingstoke, v. 51, p. 815–817, 2001.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N. C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, n. 12, p. 1581-1588, 1998.

FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C. Studies on feline babesiosis.1. Historical review. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v. 51, n. 2, p.105-106, 1980.

FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C.; VAN DEN BERG, A. A studies on feline babesiosis. 3. Haematological findings. **Journal of South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v. 51, n. 4, p. 271-280, 1980.

FUTTER, G. J.; BELONJE, P. C.; VAN DEN BERG, A.; VAN RIJSWIJK, A. W. Studies on feline babesiosis. 4. Chemical pathology; macroscopic and microscopic *post mortem* findings. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v. 52, n. 1, p. 5-14, 1981.

GAZETA, G. S.; MONTEIRO, A.; ABOUD-DUTRA, A. E. Babesiose felina no Brasil: uma nova espécie? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 13, p. 228, 2004.

GEORGE, J. W.; RIDEOUT, B. A.; GRIFFEY, S. M.; PEDERSEN, N. C. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 63, n. 8, p. 1172–1178, 2002.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 495-510.

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

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**, Washington, v. 39, n. 12, p. 4577-4578, 2001.

HARRUS, S.; KLEMENT, E.; AROCH, I.; STEIN, T.; BARK, H.; LAVY, E.; MAZAKI-TOVI, M.; BANETH, G. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **Veterinary Record**, London, v. 151, p. 82–85, 2002.

HAGIWARA, M. K. ; HOLZCHUH, M. P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis* I. Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.39, p. 745-755, 1987

HOELZLE, L. E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 215-226, 2008.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S. R.; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.

HOOVER, J. P.; WALKER, D. B.; HEDGES, J. D. Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n. 3, p. 455-460, 1994.

HORA, A. S. **Associação da infecção por *Mycoplasma haemofelis* e os vírus da leucemia e imunodeficiência em felinos anêmicos**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

INAYOSHI, M.; NAITOU, H.; KAWAMORI, F.; MASUZAWA, T. OHASHI, N. Characterization of ehrlichia species from *Ixodes ovatus* ticks at the Foot of Mt.Fuji, Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 10, p. 737-745, 2004.

INOKUMA, H.; PAROLA P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi prefecture, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, n. 4, p. 335-339, 2001.

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

ISHAK, A. M.; RADECKI, S.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*", *Bartonella* species, *Ehrlichia* species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Oxford, v. 9. n. 1, p. 1-7, 2006.

JACOBSON, L. X.; SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G. A survey of feline babesiosis in South Africa. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v. 71, n. 4, p. 222-228, 2000.

JENSEN, W. A.; LAPPIN, M. R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W. J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 62, p. 604-608, 2001.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii* . In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. (Ed.). **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 174-187.

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

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

LABARTHE, N.; DE CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKIN, J.. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON PHILLIP C; STICH ROGER W; LONG S WESLEY; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 189-95, 2007.

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

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. Prevalence of *Bartonella* species, *haemoplasma* species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Kidlington, v. 7, p. 1-6, 2005.

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A.. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal Feline Medicine and Surgery**, Kindlington, v. 8, p. 85–90, 2006.

LEGENDRE, A. M. Ehrlichiosis in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, n. 6, p. 641, 2002.

LEWIS JR., G. E.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; JOHNSON, A. J. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 36, n. 1, p. 85-88, 1975.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 19, n. 4, p. 418-431, 1997.

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

LOBETTI, R. G.; TASKER, S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v. 75, p. 94-99, 2004.

LOPES, A. P.; CARDOSO, L.; RODRIGUES, M. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, p. 184-189, 2008.

LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; PANZHORN, B. L.; WAAL, D. T.; LEWIS, B. D. A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, n. 1, p. 82-85, 1999.

LOTRIC-FURLAN, S.; PETROVEC, M.; ZUPANC, T. A.; NICHOLSON, W. L.; SUMNER, J. W.; CHILDS, J. E.; STRLE, F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, p. 424-428, 1998.

LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; LOUREIRO, V. S.; IKESAKI, J. Y. H.; BIRGEL, E. H. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatients cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 221-224, 1999.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Kidlington, v. 6, n. 5, p. 287-296, 2004.

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

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. C. A. A. de; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; McLANE, H. L.; DAGGY, J. K.; MESSICK, J. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro-Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Kidlington, v. 10, n. 2, p. 120-129, 2008.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. de; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MESSICK, J. B. Uso da técnica de Southern Blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, supl.1, p. 1-6, 2009.

MASSUNG, R. F.; SLATER, K. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p.717-722, 2003.

MATTHEWMAN, L. A.; KELLY, P. J.; WRAY, K.; BRYSON, N. R.; RYCORFT, A. N.; RAOULT, D.; MAHAN, S. M. Antibodies in cat sera from southern Africa react with antigens of *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, London, v. 138, n. 15, p. 364-365, 1996.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; McAGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 28, p.1473-1478, 1998.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M. C. F.; BRANCO, A. S.; SERRÃO, M. L.; SOUZA, A. M.; ALMOSNY, N.; CHAME, M.; LABARTHE, N. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* LINNAEUS, 1758) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 269-274, 2004.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, Malden, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.

MIRÓ, G.; MONTOYA, A.; JIMÉNEZ, S.; FRISUELOS, C.; MATEO, M. FUENTES, I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 249-255, 2004.

MORAIS, H. A.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIDOTTO, O.; BAUMANN, A.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in three cats from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Kidlington, v. 9, n. 6, p. 518-520, 2007.

MUDALIAR, S. V.; ARCHARY, G. R.; ALWAR, V. S. On a species of *Babesia* in an Indian wild cat (*Felis catus*). **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 26, p. 391-395, 1950.

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**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NEER, T. M. Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders. 1998. p. 139-147.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 1, p. 891-899, 2001.

NICHOLSON, W. L.; CASTRO, M. B.; KRAMER, V. L.; SUMNER, J. W.; CHILDS, J. E. Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic ehrlichiae (Rickettsiales: Ehrlichieae) in northern California. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3323-3327, 1999.

NYINDO, M. B. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: *in vitro* cultivation of the causative agent – *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 1, p.1651-1658, 1971.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, T.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. *Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Belo Horizonte, v.9, n.1, p.1-5, 2000.

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

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOUT, D. Tick-and-flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 36, n. 4, p. 469-492, 2005.

PASSOS, L. M. F.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZÄHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, n. 1, p. 81-85, 2005.

PEAVY, G. M.; HOLLAND, C. J.; SUKANTA, K. D.; SMITH, G.; MOORE, A.; RICH, L. J.; LAPPIN, M. R.; RITCHTER, K. Suspected ehrlichial infection in five cats from a household. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 210, n. 2, p. 231-234, 1997.

PENA, H. F.J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence,

oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

PENZHORN, B. L. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 11-21, 2006.

PENZHORN, B. L.; SCHOEMAN, T.; JACOBSON, L. S. Feline babesiosis: an endemic South African disease. **Japanese Journal of Veterinary Parasitology**, Tokio, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2006.

PENZHORN, B. L.; KJEMTRUP, A. M.; LÓPEZ-REBOLLAR, L. M.; CONRAD, P. A. *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and the relations to other piroplasms. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 3, p. 681-685, 2001.

PEREIRA, M. C.; SANTOS, A. P. *Ctenocephalides felis felis*: biologia, ecologia e controle integrado (1ª parte e biologia e ecologia). **Clínica Veterinária**, Milano, v. 16, p. 34-38, 1998.

PERRY, B. D.; SCHMIDTMANN, E. T.; RICE, R. N.; HANSEN, J. W.; FLETCHER, M.; TURNER, E. C.; ROBL, M. G.; HAHN, N. E. Epidemiology of Potomac horse fever: an investigation into the possible role of non-equine mammals. **The Veterinary Record**, London, v. 125, n. 4, p. 83-86, 1989.

PRIESTER, W. A.; HAYES, H. M. Feline leukemia after feline infectious anemia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 289-291, 1973.

QUINN, P. J.; DONNELLY, W. J. C.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K. J.; TORGERSON, P. R.; BREATHNACH, R. M. S. **Microbial and parasitic diseases of the dogs and cat**. London: W. B. Saunders Company, 1997. p. 243-251.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; CHIHARU, S.; SHIBATA, S.; FUTIHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis* and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

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

SANTOS, A. P. Haemoplasma infection in domestic cats from Porto Alegre, RS, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 95-95, 2009.

SANTOS, A. P.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; OLIVEIRA, S. T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C. S.; LACERDA, L. A.; ESTEVES, V. S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZÁLEZ, F. H. D. Design, optimization and application of a conventional PCR assay with an internal control of "Candidatus Mycoplasma turicensis" 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 38, n. 4, p. 443-452, 2009.

SCHOEMAN, T. R. G.; LOBETTI, R. G.; JACOBSIN, L. S.; PENZHORN, B. L. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and co-infections. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v. 72, n.1, p. 4-11, 2001.

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

SHAW, S. E., KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 102, p. 183-188, 2004.

SILVA, A. S. da; SILVA, M. K. da; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Amblyomma tristeem* gatos doméstico. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária / Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 108-109, 2007.

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 bacteria. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 2, 119-125, 1976.

SOARES, C. O. Entrevista: Cytauxzoonose felina é diagnosticada e isolada pela primeira vez na América Latina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 32, p. 56-58, 2001.

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

STALLIVIERE, F. M.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P. de; SARTOR, A.; MOURA, A. B. de; NEIDERMAIER, L. Ectoparasitos em *Canis familiaris* da cidade de Lages, SC, Brasil e aspectos sócio-econômicos e culturais das famílias dos proprietários dos animais. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p. 179-183, 2009.

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

SUMNER, J. W.; NICHOLSON, W. L.; MASSUNG, r. F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 35p. 2087-2092, 1997.

TABAR, M. D.; ALTET, L.; FRANCININO, O.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 151, n. 2-4, p. 332-336, 2007.

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

TAMÍ, I. C.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia sp.* Em lãs plaquetas de pacientes com infección por vírus de La inmunodeficiencia humana, em Venezuela. **Revista Panamericana de Salude Publica**, Washington, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

TASKER, S.; BINNS, S. H.; DAY, M. J. GRUFFTYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; HELPS, C. R.; JENSEN, W. A.; OLIVER, C. S.; LAPPIN, M. R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus mycoplasma haemominutum* in cats in the United King. **Veterinary Record**, London, v. 152, p. 193-198, 2003.

TASKER, S.; BRADDOCK, J. A.; BARAL, R.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; MALIK, R. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats usigin a real time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Kidlington, v. 6, p. 345-354, 2004.

TENTER, A. M. Current knowlwdge on the epidemiology of infectious with *Toxoplasma*, **Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine**, Minamiyama, v. 23, n. 6, p. 391, 1999.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

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

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**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2788-2793, 2001.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO. **Núcleo Geoambiental/Laboratório de Geoprocessamento. São Luís-Maranhão, Brasil, 2009.**

VITA, S.; SANTORI, D.; AGUZZI, I.; PETROTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 319-321, 2005.

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

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEUSARY, 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**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p.1-15, 2001.

WATANABE, M.; HISASUE, M.; HASHIZAKI, K.; FURUICHI, M.; OGATA, M.; HISAMATSU, S.; OGI, E.; HASEGAWA, M.; TSUCHIYA, R.; YAMADA, T. Molecular

detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). **Journal Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 65, n. 10, p. 1111–1114, 2003.

WEISS, E.; MOULDER, J. E. The rickettsias and chlamydias. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, sect. 9, p. 687-739.

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

WESTFALL, D. S.; JENSEN, W. A.; REAGAN, J. W.; RADECKIS, S. V.; LAPPIN, E. MR, inoculação de dois genótipos de *Felis Hemobartonella* (Califórnia e Ohio variantes) para induzir a infecção em gatos e da resposta ao tratamento com azitromicina, **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62 n. 5, p. 687-691, 2001.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M. L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 43, p. 2581–2585, 2005.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington v. 44, p. 961–969, 2006.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIORGIS, M-P.; LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 4, p.1159-1166, 2007.

WOODS, J. E.; BREWER, M. M.; KAWLEY, J. R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Evaluation of experimental transmission of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 66, n. 6, p.1008-1012, 2005.

WORMSER, G. P.; DATTWYLER, R. J.; SHAPIRO, E. D.; HALPERIN, J. J.; STEERE, A. C.; KLEMPNER, M. S.; KRAUSE, P. J.; BAKKEN, J. S.; STRLE, F.; STANEK, G.; BOCKENSTEDT, L.; FISH, D.; DUMLER, J. S.; NADELMAN, R. B. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chigago, v. 43, n. 9, p. 1089-1134, 2006.

YABSLEY, M. J.; MURPHY, S. M.; CUNNINGHAM, M. W. Molecular detection e characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* species in cougars from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 2, p. 366-374, 2006.

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

YU, X.; MCBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Restriction and expansion of *Ehrlichia strain diversity*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 337-346, 2006.

ZHANG, J.; POPOV, V. L.; GAO, S.; WALKER, D. H.; YU, X. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 610-618, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)