

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIA AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DA  
FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM LEUCÓCITOS E  
PLAQUETAS DE CÃES DE JABOTICABAL-SP E DE  
CAMPO GRANDE-MS**

**Ana Silvia D’agnone**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Setembro de 2006

D'agnone, Ana Silvia  
D126c Caracterização molecular de espécies da Família  
Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-  
SP e de Campo Grande-MS / Ana Silvia Dagnone. -- Jaboticabal,  
2006  
xxi, 118 f. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientadora: Rosângela Zacarias Machado

Banca examinadora: Matias Juan Pablo Szabó, Mirela Tinucci-  
Costa, Odilon Vidotto, Rodrigo Martins Soares

Bibliografia

1. Parasitologia. 2. Cães. 3. Filogenia. I. Título. II. Jaboticabal-  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.995.42:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**ANA SILVIA D'AGNONE** - nascida na cidade de Campinas-SP em 18 de Dezembro. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina - UEL, na cidade de Londrina - PR em 1994 sob orientação da profa. Dra. Janis R.M.Gonzalez. Durante a graduação participou de Projeto de Extensão de atendimento a Equinos da região de Londrina, e realizou diversos estágios na área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais e de Animais Silvestres todos pelo Departamento de Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes e de Pequenos Animais da UEL, respectivamente. Em 1997, concluiu o curso de Pós-Graduação (residência) em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais na Universidade Estadual de Londrina-UEL, sob orientação da profa. Dra. Carmen Esther Grumadas Machado. Realizou, na seqüência, durante fevereiro à maio ano de 1997 um Programa de Treinamento Clínico na Louisiana State Univesity School of Veterinary Medicine-Department of Veterinary Clinical Sciences, na cidade de Baton Rouge-Louisiana-Estados Unidos sob orientação do prof. Dr. Hélio S. Autran de Moraes e da Dra. Amy Grooters. Trabalhou como autônoma em Clínica Veterinária, durante os meses de julho à Dezembro de 1997 na Clínica Veterinária Dr. Riolando, cidade de Sousas-SP, e durante os anos de 1998 até 2000 na Clínica Veterinária Santa Paula, na cidade de São Carlos-SP. Ingressou no Mestrado em Sanidade Animal no ano de 2000, na área de Medicina Veterinária Preventiva, sob orientação do prof. Dr. Odilon Vidotto e co-orientação do prof. Dr. Hélio S. Autran de Moraes. Obteve o título de Mestre em 2002, com a dissertação defendida sob o título de "Soroepidemiologia e avaliação citológica e molecular por *Ehrlichia* spp em cães de uma população hospitalar". Ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária com área de concentração de Patologia Animal junto à Universidade Estadual Paulista-FCAV, Campus de Jaboticabal, em março de 2003, sob orientação da profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado.

## **A FELICIDADE EXIGE VALENTIA**

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.  
E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

**Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo."**

*Fernando Pessoa*

## DEDICO

### **Aos meus queridos pais, meu irmão e ao meu amor:**

Pelo amor, incentivo, compreensão  
Por me ensinarem a colocar acima de tudo a família,  
a realizar todas as tarefas com amor e dedicação,  
e a compreender que sempre precisaremos uns dos outros  
em todas as realizações feitas nesta vida.

### **Aos meus mais queridos amigos:**

Pela amizade incondicional,  
Por compartilharem das minhas alegrias e tristezas  
Pela paciência nos momentos difíceis

## OFEREÇO

### **Aos meus queridos cães:** Amy, Dolly, Lolita, Lilica, Tininha, Guezinho e Priscilla

Pelo afeto incondicional, mesmo nos dias mais difíceis  
Pela companhia desinteressada  
Pela dedicação e fidelidade

### **A todos os animais**

Pela enorme contribuição com meu crescimento espiritual  
Pelas lições simples de vida, respeito e de amor

## AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, minha orientadora, pelos ensinamentos de dedicação profissional, e pela imensa contribuição na minha vida acadêmica e profissional. Também pela amizade e atenção constante durante esta jornada.

À profa. Dra. Mirela Tinucci-Costa pela grande apoio, amizade e contribuições durante a colheita de material e realização deste estudo.

Aos professores **membros da Banca de Qualificação**: Dr. Adjair A. do Nascimento, Dra. Adolorata Ap. Bianco Carvalho, Dra. Mirela Tinucci-Costa, Dr. Áureo Evangelista Santana pelo auxílio na correção deste trabalho e sugestões pertinentes ao contexto da discussão.

Aos professores **membros da Banca de Defesa**: Dr. Matias J. P. Szabó, Dra. Mirela Tinucci-Costa, Dr. Odilon Vidotto e Rodrigo Martins Soares, pela enorme contribuição na correção deste trabalho

Ao professor Dr. Ângelo Berchieri Junior, pela confiança, amizade, apoio e auxílio material sempre que necessários.

Aos demais professores do Departamento de Patologia pela boa convivência e pela amizade.

Ao professor Dr. Áureo Evangelista Santana pela compreensão e auxílio durante toda a minha colheita de material no Laboratório de Patologia Clínica.

À profa. Dra. Maria Inês Tirabosche Ferro do Departamento de Tecnologia pela carinhosa atenção e pela disponibilidade de uso do Laboratório.

Ao técnico responsável do Laboratório de Patologia Clínica Eugênio, à residente Meire e ao funcionário Mateus pela grande ajuda, mesmo que indiretamente, na execução deste trabalho.

À profa. Dra. Alda I. Souza pela colaboração com algumas amostras de sangue.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária: Adriano Carrasco, Ana Carolina Trompieri, Andréa Higa Nakaghi, Andréa Bouer, Cristiane D. Baldani, Fabiano Cadiolli, Gisele M. Andrade, Joice Lara Maria Faria, Lúcia Padilha Cury, Maria Antonieta, Marcos Valério, Patrícia I. Furuta, Rosangela Y. Andrade (Tote), Trícia Oliveira e Tiago Mineo, pela amizade e bons e divertidos momentos de convivência no laboratório. E ao amigo e companheiro de bancada Marcos André, pela ajuda, companhia e grande amizade durante nosso percurso.

Aos estagiários que passaram pelo Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária e que de alguma forma puderam contribuir com este trabalho.

Às amigas: Roseli A. Carvalho e Vanete Santana, pelo ombro sempre amigo, pelo carinho e pelo companheirismo.

Ao amigo Arvelino, pela convivência, dedicação e amor dedicado com muita seriedade aos animais deste Departamento.

Aos funcionários do Departamento de Patologia: Aparecida, Antonio, Edgard, Francisca, João, Lia, Marco T. Cristóforo, Moema Ogassawara, Narciso T., que sempre me ajudaram quando precisei, colaborando sempre da melhor forma possível.

À amiga Vanessa C. Morgan do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV-Unesp de Jaboticabal pelo auxílio técnico e ótimos momentos de amizade e convivência.

Ao pós-graduando Luciano T. Kishi pelo tempo dedicado e pela grande ajuda na realização dos estudos de filogenia molecular.

Às minhas amigas de sempre: Bárbara C. Mazzucatto, Alexandra Silva, Melissa Dagnoni, Cláudia M. Escrivão, Andréa R. Izzo, Ellen Márquez, Maria Francisca Neves, Patrícia Lucas, Silvia Cistina Osaki e Sheila Wosiacki, pelo apoio e pela amizade eterna, mesmo que distante.

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, na área de Patologia Animal.

Às funcionárias da Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV-Unesp de Jaboticabal pela atenção, educação e auxílio sempre que necessário.

Às bibliotecárias da Biblioteca da FCAV-Unesp de Jaboticabal pelo auxílio e contribuições de correção desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Doutorado.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Infecção por agentes da Família Anaplasmataceae.....	3
2.2 Diversidade antigênica e Mecanismos de escape das erlíquias .....	8
2.3 Nomenclatura e Classificação Taxonômica.....	10
2.4 Diagnóstico e Caracterização Molecular.....	10
2.5 Genes específicos para Análise Filogenética.....	12
2.6 Filogenia Molecular.....	15
2.6.1 Reação de Seqüenciamento.....	15
2.6.2 Bioinformática.....	16
2.6.3 GenBank.....	17
2.6.4 BLAST.....	18
2.6.5 Clustal-X.....	18
2.6.6 Filogenia.....	19
2.6.7 Árvores Filogenéticas.....	19
2.6.8 Programa de Análise Genética Evolucionária Molecular – MEGA-2.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 ObjetivoS Específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Seleção dos animais.....	24
4.2 Colheita das amostras.....	24
4.3 Exames Citológicos.....	24
4.3.1 Esfregaço sangüíneo de papa de leucócitos.....	24
4.4 Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	25
4.4.1 Obtenção dos controles positivos.....	25
4.4.2 Extração do material genômico (DNA) .....	25
4.4.3 Análise dos oligonucleotídeos Iniciadores.....	26
4.4.3.1 Espécie <i>Ehrlichia canis</i> .....	26
4.4.3.2 Espécie <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....	26
4.4.3.3 Membros do Genogrupo- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	27



4.4.3.4	Espécie <i>Anaplasma platys</i> .....	27
4.4.3.5	Espécie <i>Ehrlichia ewingii</i> .....	27
4.4.3.6	Espécie <i>Anaplasma phagocytophilum</i> – gene 16S rRNA.....	27
4.4.3.7	Espécie <i>Anaplasma phagocytophilum</i> – gene msp2.....	28
4.4.3.8	Espécie <i>Neorickettsia risticii</i> .....	28
4.4.3.9	Espécie <i>Babesia canis</i> .....	28
4.4.3.10	PCR para obtenção de amplicómeros para Seqüenciamento.....	29
4.4.4	Amplificação pela técnica da PCR.....	29
4.4.5	Detecção dos produtos amplificados (amplicómeros).....	35
4.5	Reação de Seqüenciamento.....	35
4.5.1	Extração dos amplicómeros do Gel de Agarose.....	35
4.5.2	Quantificação de DNA dos amplicómeros.....	35
4.5.3	Reação de Seqüenciamento.....	36
4.6	Análise dos resultados obtidos no Seqüenciamento.....	37
4.7	Reações de Digestão com Enzimas de Restrição.....	38
5.	RESULTADOS.....	40
5.1	Visualização e identificação das inclusões citoplasmáticas.....	40
5.2	Detecção de DNA de agentes da Família Anaplasmataceae.....	44
5.3	Detecção de DNA de <i>Babesia canis</i> .....	47
5.4	Seqüenciamento das amostras positivas para Família Anaplasmataceae com amplicómero, produto dos oligonucleotídeos iniciadores 750R e EC3.....	48
5.5	Seqüenciamento das amostras positivas para o Genogrupo <i>Anaplasma phagocytophilum</i> com amplicómero, produto dos oligonucleotídeos iniciadores gE3a e gE10R.....	48
5.6	Análise de similaridade das seqüências obtidas pelo BLAST.....	49
5.7	Demonstração de Dendogramas Filogenéticos das seqüências obtidas dos amplicómeros com alinhamento múltiplo pelo CLUSTAL-W e Mega-2.....	57
5.8	Perfil de digestão dos amplicómeros, produtos da PCR com endonucleases de restrição para o Genogrupo <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	63
6.	DISCUSSÃO.....	66
7.	CONCLUSÕES.....	77
8.	REFERÊNCIAS.....	78
9.	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.....	100
9.1.	“Detection of Anaplasmataceae agents DNA in dog blood samples with intracellular inclusions from Jaboticabal –SP and Campo Grande – MS, Brazil.”...	100
9.2.	“Molecular characterization of <i>Ehrlichia canis</i> and <i>Anaplasma platys</i> organisms found in dog blood samples from Brazil”.....	100

APÊNDICES.....	101
A. Lista de reagentes.....	102
B. Lista de equipamentos utilizados.....	104
C. Lista de programas (softwares) utilizados.....	106
D. Protocolos de Citologia.....	107
E. Protocolos Biologia Molecular.....	108
Extração de DNA.....	108
Tampão Tris-EDTA-Ácido Bórico (TEB).....	109
Tampão de Amostra.....	110
Diluição do marcador de tamanho molecular 100pb.....	110
Diluição dos Oigonucleotídeos iniciadores.....	111
Preparo do “Mix” dos dNTP’s.....	111
Preparo de Gel de Agarose.....	112
Extração de Amplímeros de Gel de Agarose.....	113
Reação de Seqüenciamento.....	115
Digestão enzimática dos amplímeros da PCR do Genogrupo A. <i>phagocytophilum</i> .....	116
<i>Ava I</i> .....	116
<i>Bpml</i> .....	116
<i>Eco NI</i> .....	117
Digestão enzimática dos amplímeros da PCR de <i>Babesia canis</i> .....	118
<i>Taq I</i> .....	118
<i>Hinf I</i> .....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS

p	Probabilidade
$\lambda$	Lâmbda
<sup>TM</sup>	<i>Trade Mark</i>
®	Marca Registrada
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
16S rRNA	Porção 16S do RNA ribossômico
18S rRNA	Porção 18S do RNA ribossômico
23S rRNA	Porção 23S do RNA ribossômico
a	Base Púrica Adenina
<i>Ava</i> I	Enzima de restrição – <i>Anabaena variabilis</i>
<i>Bpm</i> I	Enzima de restrição – <i>Bacillus pumilus</i>
c	Base Pirimídica Citosina
dATP	Deoxinucleotídeo Adenina
dTTP	Deoxinucleotídeo Timina
dCTP	Deoxinucleotídeo Citosina
dGTP	Deoxinucleotídeo Guanina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
e	Valor esperado
<i>Eco</i> NI	Enzima de restrição – <i>Escherichia coli</i> CDCA-193
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g.	Gram
g	Base Púrica Guanina
<i>Hinf</i> I	Enzima de restrição - <i>Haempphilus influenzae</i> Rf
IFI	Imunofluorescência Indireta
Kb	Kilo base (1000 pares de bases)
Kg	Kilograma
L	Litro
Ma	Miliampères
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
ML	Mililitro
mM	Milimolar
n.	Número
ng	Nanograma
nPCR	“nested” Reação em cadeia pela polimerase
°C	Graus Celsius
p.	Página
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase

pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r	Raio
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
S	Escore
t	Base Pirimídica Timina
Taq	Enzima DNA polimerase do <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Taq I</i>	Enzima de restrição - <i>Thermus aquaticus</i> YT-1
TE	Solução de Tris - EDTA
TEB	Solução de Tris - EDTA - Ácido Bórico
U	Unidade
V	Volts
v.	Volume
x g	Gravidade

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e “nested” PCR para agentes da Família Anaplasmataceae, com a descrição dos tamanhos dos amplicómeros e referência utilizada.....	30
Tabela 2. Descrição das seqüências térmicas e de tempo para as reações de PCR e “nested” PCR para agentes da Família Anaplasmataceae.....	32
Tabela 3. Descrição das seqüências térmicas e de tempo para as reações de PCR seguida de reações de seqüenciamentos para agentes da Família Anaplasmataceae.....	34
Tabela 4. Comparação da Homologia entre as seqüências dos amplicómeros obtidos na PCR com os oligos 750F/EC3 de fragmento do gene 16S rRNA para <i>Ehrlichia</i> spp e <i>Anaplasma</i> spp (Família Anaplasmataceae) (691pb) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da Porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST (eValue=0).....	52
Tabela 5. Comparação da Homologia entre as seqüências dos amplicómeros obtidos na PCR com os oligos 750F/EC3 de fragmento do gene 16S rRNA para <i>Ehrlichia</i> spp e <i>Anaplasma</i> spp (Família Anaplasmataceae) (691pb) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da Porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST com as amostras integrais sem alinhamento prévio (eValue=0).....	55
Tabela 6. Comparação da Homologia entre as seqüências dos amplicómeros obtidos em PCR com os oligos gE3a/Ge10R de fragmento do gene 16S rRNA do Genogrupo <i>A. phagocytophilum</i> (Família Anaplasmataceae) (930pb) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da Porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST com as amostras integrais sem alinhamento prévio.....	56
Tabela 7. Resultados obtidos pela PCR e “nested” PCR para detecção de agentes da Família Anaplasmataceae, realizados em 55 amostras de sangue de cães naturalmente infectados, oriundos	

da cidade de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS, no ano  
2004..... 64

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para <i>E. canis</i> e PCR para <i>A. platys</i>. Observar a grande variação na forma, coloração e tamanho das inclusões erliquiais. Fotos <b>A</b> a <b>D</b> com morfologia compatível com corpúsculos elementares; <b>E</b> a <b>I</b> com corpúsculos iniciais; <b>J</b> a <b>S</b> com mórulas de <i>E. canis</i>; e <b>T</b> a <b>X</b> com inclusões intraplaquetárias. Coloração Giemsa. Objetiva 100 X.....</p>	41
<p>Figura 2. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para <i>E. canis</i>, demonstrando formas sugestivas de corpúsculos elementares erliquiais (seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100 X.....</p>	42
<p>Figura 3. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para <i>E. canis</i>, demonstrando formas sugestivas de corpúsculos iniciais erliquiais (seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100 X.....</p>	42
<p>Figura 4. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para <i>E. canis</i>, demonstrando formas sugestivas de mórulas erliquiais (seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100X.....</p>	43
<p>Figura 5. Fotografias de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto <b>A</b> são relativos à PCR para <i>Ehrlichia</i> spp obtidos com oligonucleotídeos iniciadores ECC/ECB e têm tamanho aproximado de 478 pares de bases. A foto <b>B</b> mostra amplicómeros formados na reação de “nested” PCR para a espécie <i>E. canis</i>, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CAN/GAIUR e têm tamanho aproximado de 358 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra <i>E. canis</i>-Jaboticabal); canaletas 2 à 16: amostras testadas e canaleta 17: controle negativo da reação.....</p>	45
<p>Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos a PCR para <i>Anaplasma platys</i> obtidos com oligonucleotídeos iniciadores Platys-F/Platys-R, e têm tamanho aproximado de 504 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases</p>	

- (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *A. platys*- Campo Grande); canaletas 2 à 10: amostras testadas; e canaleta 11: controle negativo da reação..... 45
- Figura 7. Fotografias de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto **A** são relativos a PCR para o gênero *Anaplasma*, obtidos com oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R e têm tamanho aproximado de 932 pares de bases. A foto **B** mostra amplicómeros formados na reação de “nested” PCR para todos os membros do Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores gE9F/gE2R e têm tamanho aproximado de 546 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *Anaplasma phagocytophilum*- Mariland, Estados Unidos); canaletas 2 a 16: amostras testadas; e canaleta 17: controle negativo da reação..... 46
- Figura 8. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Babesia canis* obtidos com oligonucleotídeos iniciadores Piro-A/Piro-B, e têm tamanho aproximado de 400 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *Babesia canis*- São Paulo); canaletas 2 a 9: amostras testadas; e canaleta 10: controle negativo da reação..... 47
- Figura 9. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Ehrlichia* spp, obtidos com oligonucleotídeos iniciadores 750F/EC3, e têm tamanho aproximado de 690 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *E. canis*- Jaboticabal); canaletas 2 a 11: amostras positivas; e canaleta 12: controle negativo da reação..... 48
- Figura 10. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para Família Anaplasmataceae: gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “Bootstrap” de 1.000 repetições. As seqüências nativas foram enumeradas de acordo com o critério de entrada no



- estudo (ordem crescente), e as seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank. .... 59
- Figura 11. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para o Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*, obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 1.000 repetições. As seqüências nativas foram enumeradas de acordo com o critério de entrada no estudo (ordem crescente), e as seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank..... 60
- Figura 12. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para *Babesia canis*, obtidas com seqüências parciais do gene 18S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 1.000 repetições. As seqüências nativas foram enumeradas de acordo com o critério de entrada no estudo (ordem crescente), e as seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank..... 61
- Figura 13. Dendograma Filogenético com seqüências parciais do gene 16S rRNA exibindo comparação de duas amostras representativas de Jaboticabal-SP, pertencentes à Família Anaplasmataceae: *Ehrlichia canis* (número de acesso do GenBank DQ 40.144) e *Anaplasma platys* (número de acesso do GenBank DQ 40.145) obtidas de sangue de cães naturalmente infectados com amostras disponíveis no GenBank. Alinhamento múltiplo com o Clutal-W, método de construção calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com método de distância Kimura-2 parâmetros e com "Bootstrap" de 1.000 repetições. As seqüências disponíveis no GenBank utilizadas nas comparações estão indicadas pelo Gênero e espécie seguidos pelo número de acesso do GenBank..... 62
- Figura 14. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para o Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*, obtidos com oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R, e têm tamanho aproximado de 932 pares de bases, e digestão com endonucleases de restrição Aval and EcoNI .Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de

bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo puro de *Anaplasma phagocytophilum* (amostra Estados Unidos), canaleta 2: controle positivo puro de *Anaplasma platys* (amostra Campo Grande); canaleta 3: controle positivo de *Anaplasma phagocytophilum* não clivado com *Ava I*; canaleta 4: controle positivo de *Anaplasma platys* clivado com *Ava I* em fragmentos de 561 pb e de ~369pb; canaletas 5 e 6: controle positivo de *Anaplasma phagocytophilum*; e controle positivo de *Anaplasma platys* clivados com *Eco N I* em fragmentos de 280 pb e de ~650pb..... 63

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM LEUCÓCITOS E PLAQUETAS DE CÃES DE JABOTICABAL-SP E DE CAMPO GRANDE-MS

**RESUMO** - Este estudo foi realizado objetivando-se detectar e identificar a presença de material genômico de agentes pertencentes à Família Anaplasmataceae em 55 cães com inclusões citoplasmáticas encontrados em células leucocitárias granulocíticas, monocíticas e plaquetas, compatíveis com infecção por *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* ou *Neorickettsia risticii*. A ocorrência natural de *Babesia canis* também foi avaliada pois vetor *Rhipicephalus sanguineus*, é o principal carrapato encontrado em cães no Brasil. Também objetivou-se realizar, através da utilização de técnicas de Seqüenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA, a caracterização parcial dos fragmentos das amostras positivas encontradas neste estudo, e comparar as seqüências dos fragmentos obtidos com as seqüências apresentadas previamente no GenBank™, iniciando a realização de estudos filogenéticos das seqüências encontradas. Amostras de sangue foram colhidas de 25 e 30 cães atendidos nos Hospitais Veterinários da Universidade Estadual Paulista-Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP e Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da região do Pantanal-UNIDERP, Campo Grande- MS, respectivamente. Dentre as inclusões citoplasmáticas encontradas neste estudo foi observado uma grande diversidade na morfologia, tamanho, coloração e localização das inclusões. DNA de agentes Família Anaplasmataceae foram detectados em 45/55 das amostras sangüíneas examinadas (81,8%), sendo destas 32 (58,18%) e 13 (23,63%) positivas para *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, respectivamente. Dez animais que foram incluídos neste estudo por apresentarem inclusões citoplasmáticas foram negativos quando uma segunda confecção de esfregaço de papa leucocitária corada pelo Giemsa foi realizada, e também apresentaram resultados negativos na PCR para todos os agentes testados. A análise de similaridade obtida pelo Blast das seqüências obtidas com as amostras positivas para *Ehrlichia canis* com seqüências do gene 16S rRNA

disponíveis no GenBank de algumas espécies relacionadas, pode demonstrar uma similaridade variando de 94,82% a 99,67% com uma amostra de *E. canis* da Espanha (número de acesso no GenBank AY 394 465). As seqüências obtidas para *Anaplasma* spp neste trabalho apresentaram similaridade variando de 96,52% a 99,69% com uma amostra de *A. platys* da Venezuela (número de acesso no GenBank AF 399 917), e 96,52% a 99,38% com uma amostra de *A. platys* da Espanha (número de acesso no GenBank AY 530 806). Este mesmo padrão de similaridade pôde ser observado quando foi realizada o alinhamento múltiplo utilizando-se o programa Clustal-W e a formação dos dendogramas filogenéticos utilizando-se o programa Mega-2.1 com o método de construção de “Neighbor-joining”, método de distância de Kimura-2 parâmetros e com 1000 repetições para definir relacionamentos entre as amostras.

Quatro amostras provenientes de Jaboticabal e uma de Campo Grande foram positivas na PCR para *Babesia canis*, com padrão de clivagem obtido pelas enzimas de restrição *Taq I* e *Hinf I* compatível com *Babesia canis vogeli*.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia* sp, *Anaplasma* sp, cães, Papanicolaou, PCR, filogenia

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ANAPLASMATACEAE AGENTS DNA IN DOG BLOOD SAMPLES FROM JABOTICABAL-SP AND CAMPO GRANDE-MS, BRAZIL

**SUMMARY** –The aim of this study was to evaluate the natural occurrence of Anaplasmataceae agents (*Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* and *Neorickettsia risticii*) using molecular techniques. For this purpose a group of fifty-five supposedly infected dogs from two different Brazilian states (São Paulo and Mato Grosso do Sul) that showed suggestive Anaplasmataceae agent intracytoplasmic inclusions in white blood cells and platelets were analysed. The natural occurrence of *Babesia canis* was also evaluated, because its vector is also Brazilian dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Sequencing of a partial phragment of 16S rRNA gene from the positive samples were performed to conduct phylogenetic study. The evaluated blood cells of the studied dog population displayed a wide variety in shapes, sizes, stain pattern and localization of the inclusions. Anaplasmataceae DNA were amplified in 45/55 (81.8%) examined blood samples. Thirty-two samples were positive for *E. canis* (58.18%) and thirteen for *Anaplasma platys* (23.63%). Ten animals were negative by PCR and an analyses of a second Buffy coat smear. The obtained nucleotide sequences were analysed for similarity of the 16S rRNA gene sequence using Blast with other sequences available in the GenBank database. The sequences obtained from *E. canis* positive were closely related to *E. canis* from Spain (Acession number AY 394465) presenting an identity percentage of between 94.82% and 99.67%. Sequences from *Anaplasma sp* and *Anaplasma platys* positive samples were closely related to *A. platys* from Venezuela (Genbank Acession number AF 399917) presenting an identity betwwen 96.52% and 99.69%, and *A. platys* from Spain (Genbank Acession number AY 530 806\0 presenting an identity between 96.52% and 99.38%, respectively. This similarity pattern was also observed when the sequences were aligned with the Clustal-X software, and phylogenetic trees were made using the Mega-2.1 software with components Neighbor-joining, Kimura-2 parameters and 1,000

bootstrap replicates in order to define the relationships among the samples. Four samples from Jaboticabal e one from Campo Grande were *Babesia canis* positive by PCR with cleavage pattern with restriction enzymes *Taq* I and *Hinf* I from *Babesia canis vogeli*.

**Key-words:** *Ehrlichia* sp, *Anaplasma* sp, dogs, Buffy coat, PCR, Phylogeny

## 1. INTRODUÇÃO

Os canídeos podem ser infectados por diversos agentes pertencentes à Família Anaplasmataceae, como a *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum*. A *Neorickettsia risticii* também foi descrita em infecção natural em cães, mas o possível vetor biológico e reservatório não foram identificados.

Erlíquioses são importantes doenças bacterianas zoonóticas transmitidas por carrapatos. As plaquetas, células endoteliais, monócitos, macrófagos, eritrócitos e células de invertebrados são especificamente infectadas, dependendo da espécie bacteriana. A bactéria reside no interior da célula hospedeira dentro de corpúsculos de inclusão, em estruturas denominadas de mórulas, as quais fornecem um ambiente favorável para a sua sobrevivência. Os mecanismos que levam ao estabelecimento e manutenção das mórulas erliquiais dentro das células hospedeiras ainda permanecem pouco conhecidos.

A *E. canis*, agente da erliquiose monocítica canina (EMC), foi a primeira espécie descrita em cães, na Argélia e, mais tarde, foi responsável pela morte de um grande número de cães militares no Sudeste da Ásia. Apesar de muitas espécies da Família Anaplasmataceae infectarem os cães, a *E. canis* permanece como o agente mais conhecido.

No Brasil, a presença de *E. canis* foi documentada pela primeira vez, no ano de 1973, em Belo Horizonte-MG. Posteriormente, a *E. canis* foi descrita em outras regiões brasileiras. Em 1993, foi realizado o primeiro isolamento brasileiro da *E. canis*, na cidade de Jaboticabal-SP, e, desde então, o grupo do Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV- Unesp de Jaboticabal, tem utilizado essa amostra para vários estudos sobre a imunopatologia e diagnóstico da erliquiose monocítica canina.

A alta soroprevalência encontrada na região de Jaboticabal-SP, com valores entre 63,33% e 92,31%, demonstra a importância da caracterização das espécies que infectam os animais desta região.

Essa caracterização adquire ainda maior importância, pois a ocorrência natural de agentes da Família Anaplasmataceae (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *E. ewingii*, *N. risticii* e *N. senettsu*), em cães no Brasil, ainda não está bem estabelecida.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecção por agentes da Família Anaplasmataceae

Erlíquioses e anaplasmoses são doenças causadas por organismos bacterianos que são Gram-negativos e intracelulares obrigatórios, e que apresentam como vetores principais os carrapatos (MADEWELL et al., 1982; et al., 1996; EWING et al., 1997; DAWSON; INOKUMA et al., 2001). São patógenos para seres humanos e animais (KAKOMA et al., 1994; WANER e DAWSON, 1996; DAGNONE et al., 2001). Uma reorganização dos membros pertencentes à Ordem Rickettsiales foi proposta em 2001 por DUMLER et al., com os gêneros *Rickettsia* e *Orientia* pertencendo à Família Rickettsiaceae, e os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, à Família Anaplasmataceae.

*Ehrlichia* e *Anaplasma* spp podem ser mantidas através de um ciclo enzoótico entre animais silvestres e carrapatos sugadores de sangue e podem, acidentalmente, infectar os seres humanos e os animais domésticos (RIKIHISA, 2003).

Infecção erliquial foi reconhecida pela primeira vez, em 1935, como causa de doença em cães na Argélia (DONATIEN e LESTOQUARDT). Porém, somente na década de 70, a espécie *Ehrlichia canis* se tornou familiar nos Estados Unidos, devido a um grande surto em cães do exército americano no Vietnã, responsável pelo óbito de centenas deles (HUXSOLL et al., 1969; HUXSOLL et al., 1970). Desde então, outras espécies causadoras da doença em cães foram descritas.

No Brasil, a presença de *E. canis* foi documentada pela primeira vez no ano de 1973, em Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais (COSTA et al.). Posteriormente, foi descrita no ano de 1976, no Estado do Rio de Janeiro (SEIBERT et al., 1997); em 1978, no município de Jaboticabal, Estado de São Paulo (MAREGATI apud KAVINSKI, 1988); e, em 1979, na cidade de São Paulo por HAGIWARA (SEIBERT et al., 1997). Desde então, a *E. canis* foi descrita em outras regiões brasileiras (YAMAMURA e VIDOTTO, 1982; SILVEIRA et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2000; DAGNONE et al., 2003;

CASTRO et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005). Uma alta soroprevalência para *E. canis* foi encontrada na região de Jaboticabal-SP, com valores de 63,33% (NAKAGHI et al., 2004), 67,7% (FURUTA et al., 2004) e 92,31% (OLIVEIRA et al., 2000). Assim, esses altos valores encontrados corroboram a importância de uma caracterização das espécies que infectam os animais desta região.

O primeiro isolamento em cultivo celular e caracterização antigênica de um agente erliquial proveniente de um cão da América do Sul foi descrito em 2001 (UNVER et al.). A *E. canis* foi também isolada de um ser humano na Venezuela, e a amostra foi geneticamente e antigenicamente relacionada à amostra de *E. canis*-Oklahoma (PEREZ et al., 1996).

A erliquiose monocítica canina (EMC), causada pela *E. canis*, é uma doença potencialmente fatal, transmitida pelo carrapato marrom do cão, o *Rhipicephalus sanguineus* (TENG et al., 2003). A EMC é uma síndrome altamente variável, apresentando dificuldades significativas no diagnóstico diferencial com outras doenças. Ela pode apresentar quadros clínicos similares a muitas doenças infecciosas e metabólicas, e também não apresenta um critério de diagnóstico padronizado, reagentes e recursos de dados comuns que possam servir de suporte entre laboratórios. Alguns parâmetros clínicos não são observados, especialmente em formas atípicas da doença, quando causadas por outras espécies diferentes da *E. canis*. Variações na etiologia, potencial e susceptibilidade do hospedeiro, heterogenicidade da amostra e a omissão freqüente da erliquiose no diagnóstico diferencial são fatores que contribuem para a natureza confusa da erliquiose canina (COUTO et al., 1998; KAKOMA et al., 2000).

Outro inconveniente no diagnóstico de infecções por agentes erliquiais é a presença de algumas reações cruzadas nos testes sorológicos, como ocorre com a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *E. canis* e *E. chaffeensis* (NEER et al., 2002). Também, o encontro de inclusões intracitoplasmáticas ou mórulas, em células infectadas, ao exame de esfregaços sangüíneos pode ter valor diagnóstico (DUPLESSIS et al., 1990), porém mórulas podem não ser observadas em vários casos, mesmo quando confirmados por outros critérios diagnósticos (ELIAS, 1991; MASSUNG

et al., 1998). A espécie mais amplamente estudada é a *E. canis*, a qual geralmente serve como modelo para o entendimento de outras espécies erliquiais (PREOZI e COHN, 2002). Normalmente, o padrão de distribuição geográfico das várias espécies erliquiais está relacionado à distribuição dos vetores. Infecções simultâneas com vários patógenos transmitidos por carrapatos são possíveis e podem contribuir para o quadro clínico diverso em cães (EWING et al., 1971). Também um mesmo vetor artrópode pode servir como transmissor de vários gêneros e espécies.

O diagnóstico é geralmente baseado nos sinais clínicos, alterações em exames laboratoriais consistentes e testes específicos para erlíquias. Embora a observação de mórulas intracelulares confirme o diagnóstico, a pesquisa destas é, na maioria das vezes, insatisfatória (ELIAS, 1991). Entretanto, o uso de técnicas de concentração, como o exame da camada leucocitária (“Buffy coat”), com o uso de colorações derivadas de Romanowsky, maximizam a chance de identificação de mórulas (HUXSOLL et al., 1970).

Avaliando a acurácia de exames citológicos na detecção da presença de mórulas (HILDEBRANDT et al., 1973), em esfregaço de sangue total, papa de leucócitos, aspirado de medula óssea e “imprint” (decalque) de linfonodos, MYLONAKIS et al. (2003) mostraram resultados de maior sensibilidade com a papa de leucócitos (66%) e com o decalque (60,9%). DAGNONE (2002), comparando esfregaço de papa de leucócitos com a PCR, evidenciou maior sensibilidade da PCR. Também, com relação à citologia, alguns artefatos associados à inexperiência técnica podem conduzir na indução de resultados falso-positivos. Assim, sobreposição de plaquetas nas células, grânulos azurófilos inespecíficos linfocíticos, corpos linfo-glandulares e material nuclear fagocitado podem ser confundidos com mórulas, corpúsculos elementares e de inclusão erliquiais (SCHALM, 2000; HEEB et al., 2003; MYLONAKIS et al., 2003). MYLONAKIS et al. (2003) encontraram 6/80 cães positivos na PCR para *Anaplasma (Ehrlichia) platys* e, desses seis, apenas um apresentava inclusões em plaquetas.

O método sorológico mais comumente empregado é a RIFI. Porém, como a sorologia pode apresentar reatividade cruzada entre diferentes espécies erliquiais, quando utilizada em associação com a PCR pode auxiliar na diferenciação de

exposição atual ou presença de anticorpos em animal tratado com sucesso (BREITSCHWERDT et al., 1998; SUKASAWAT et al., 2000). Atualmente, existem vários testes sorológicos rápidos e de fácil realização, que podem ser utilizados rotineiramente em clínicas veterinárias (HARRUS et al., 2002).

Cães com sintomas sugestivos de erliquiose canina, porém sem a presença de mórulas, freqüentemente falham em fornecer uma reação positiva na PCR com alvo no gene 16S rRNA de amostra específica de *E. canis* dos Estados Unidos (ALLSOPP e ALLSOPP, 2001). Na EMC, o uso de amostras de sangue como material para a realização da PCR pode resultar em falso-negativos, mesmo em animais em fase aguda da doença, visto que a parasitemia desse agente é normalmente baixa e pode não ser suficiente para fornecer material que venha a ser positivo.

Na fase crônica, a detecção de material genômico se torna ainda mais difícil em amostras clínicas de mais fácil colheita e menos invasivas, como o sangue. O uso de material obtido por técnicas mais invasivas como aspirado de baço, nesta fase, pode aumentar a sensibilidade da técnica da PCR (HARRUS et al., 2004). Porém, rotineiramente, essa forma de colheita é dispendiosa, consome tempo, requer pessoal técnico capacitado e, muitas vezes, que o animal esteja sedado e até anestesiado. Além disso, o perfil de coagulação deve estar dentro da normalidade, o que, na maioria das vezes, não ocorre com a erliquiose.

FARIA (2006), em um estudo comparativo de sensibilidade utilizando a “nested” PCR de sangue e de aspirado de baço de quarenta cães cronicamente infectados por *E. canis*, observou que não houve diferença na sensibilidade de detecção de DNA em ambos os materiais biológicos utilizados, porém a presença de mórulas em leucócitos foi positiva em dezessete amostras de um total de 35 positivas na biópsia aspirativa de baço.

O *Anaplasma platys* (anteriormente denominado de *Ehrlichia platys*), foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1978, (HARVEY et al.) e, posteriormente, no Japão (INOKUMA et al., 2001). Esse agente infecta especificamente plaquetas de cães e causa uma doença denominada trombocitopenia infecciosa cíclica canina, com patogenia não tão severa quanto aquela causada pela *E. canis*, mas com a

trombocitopenia persistindo por 7 a 10 dias, seguida por um período de recuperação. Ocorre, então, cursos cíclicos de alterações plaquetárias (INOKUMA et al., 2002).

*Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente denominada de *Ehrlichia phagocytophila*) é o agente etiológico da anaplasmoze granulocítica humana (Human Granulocytic Anaplasmosis -HGA) e anaplasmoze granulocítica animal (AGA), incluindo os cães, causando uma doença de curso agudo e autolimitante (SCORPIO et al., 2004).

A co-infecção com mais de uma espécie erliquial ou com outros hemoparasitas é comum (BREITSCHWERDT et al., 1998; SUKASAWAT et al. 2000; SUKASAWAT et al. 2001). A *Babesia canis* é encontrada com frequência com a *E. canis* (EWING e BUCKNER, 1965; SIMPSON, 1972; MORAIS et al., 2003; TRAPP et al., 2006), porém é mais facilmente reconhecida em esfregaços sangüíneos pela presença de piroplasmas, enquanto as mórulas erliquiais são mais difíceis de serem detectadas, devido à parasitemia baixa (DUPLESSIS et al., 1990).

Técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que permitem ampliações de material genômico (DNA), estão sendo cada vez mais utilizadas como importantes métodos complementares aos testes sorológicos e evidências clínicas no diagnóstico das doenças erliquiais em seres humanos e animais. A seqüência do RNA ribossomal de pequena subunidade (rRNA) varia de uma maneira ordenada através de linhagens filogenéticas, e contém segmentos que são conservados entre espécie, gênero ou reino.

Com o uso de oligonucleotídeos iniciadores que anelam diretamente em seqüências conservadas no genoma das Eubactérias, a amplificação de seqüências do gene 16S rRNA pela PCR pode ser útil para propósitos de seqüenciamento e uso de sondas. Ainda possui uma ampla variedade de aplicações, incluindo a detecção e identificação de patógenos conhecidos ou novos, os quais são difíceis de serem cultivados (LEW e JORGENSEN, 2005; WILSON et al., 1990). Também, como alguns segmentos do rRNA são conservados, enquanto outros são variáveis em diferentes graus, é possível gerar oligonucleotídeos complementares a segmentos que são específicos para qualquer nível da árvore filogenética, do Reino às espécies (GIOVANONNI et al., 1988).

O seqüenciamento genético automatizado permitiu uma grande quantidade de comparações filogenéticas moleculares das espécies (LEW e JORGENSEN, 2005). Atualmente, árvores filogenéticas são amplamente utilizadas como modelo evolucionário aceito e são, na maioria das vezes, baseadas em seqüências de aminoácidos ou de DNA, pois, entender a origem e evolução das espécies existentes e até extintas, é uma questão científica fundamental (CHOR e TULLER, 2005).

A utilização de métodos auxiliares moleculares demonstrou ser muito eficaz em um caso de anaplasiose humana que apresentou reação de PCR positiva, porém apresentou resultado soronegativo para este agente por mais de seis meses após a detecção molecular do patógeno (de LA FUENTE et al., 2005). Outros testes moleculares baseados em reações múltiplas de PCR, denominadas de Multiplex PCR, também têm sido utilizados para facilitar o diagnóstico de co-infecção por agentes da Família Anaplasmataceae (SIRIGIREDDY e GANTA, 2005). Uma reação de PCR em Tempo Real Tricolor foi desenvolvida por DOYLE et al. (2005), sendo capaz de, em uma única reação, detectar simultaneamente e discriminar erlíquias importantes para a medicina humana, como a *E. chaffeensis*, *E. canis* e *E. ewingii*.

## **2.2 Diversidade antigênica e Mecanismos de escape das erlíquias**

A diversidade antigênica entre organismos erlíquias pelo mundo, como já citado anteriormente, pode ser uma das razões para a variedade nos sinais clínicos descritos em diferentes regiões geográficas (HARRUS et al., 1999). Portanto, tal diversidade contribui para a dificuldade de realização do diagnóstico da doença em determinada região em relação a outra. Há locais onde há descrição de erlíquiose com sinais clínicos específicos e com comprovação laboratorial (DAGNONE et al., 2003; NAKAGHI et al., 2004), porém, modificações antigênicas, moleculares e morfológicas, nas amostras encontradas no Brasil, poderiam levar a diferentes sintomatologias, quando comparadas às descritas em outros países.

A resposta imune humoral a antígenos similares ou que apresentam reação cruzada não parece ter papel na imunidade contra as erlíquias. Apesar da considerável

reatividade cruzada na Imunofluorescência Indireta entre a *E. canis* e *E. chaffeensis*, a inoculação prévia de um cão com *E. chaffeensis* não preveniu o desenvolvimento de sinais clínicos da erliquiose monocítica canina após desafio com *E. canis* (DAWSON e EWING , 1992).

Entre os organismos erliquiais há grande diversidade com relação aos mecanismos imunológicos e patológicos. Tal diversidade também dificulta padronização de meios diagnósticos, principalmente com o cultivo celular, que é uma ferramenta importante na obtenção de antígenos para utilização em outros meios diagnósticos, como a RIFI, PCR, ELISA e Seqüenciamentos.

*Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp apresentam mecanismos sofisticados que auxiliam na subversão da resposta imune inata do hospedeiro (RIKIHISA, 2006). Algumas características importantes foram estudadas principalmente com o agente da anaplasiose (erliquiose) granulocítica humana (HGA), que apresenta um mecanismo de associação à prostaglandina-1, o qual, provavelmente, permite que a bactéria escape ou modifique a via fagocítica do neutrófilo, para que, então, possa sobreviver e se multiplicar dentro da célula neutrofílica infectada (RIKIHISA, 2006). Os mecanismos que levam ao estabelecimento e manutenção das mórulas erliquiais dentro das células hospedeiras, e pelos quais as erlíquias infectam diferentes tipos celulares são diversos e ainda permanecem pouco conhecidos (TENG et al., 2003). Células susceptíveis ao agente da HGA (HGE) expressam um ligante para selectinas (CD15s), o qual facilita a infecção pelo agente da HGA nas células neutrofílicas (BOJERSSON, 2000). O agente da HGA pode ter acesso ao elemento ferro de outras fontes, em adição ao ferro normalmente disponível no “pool” de ferro que outras erlíquias, como a *E. chaffeensis* e *E. sennetsu*, utilizam (BARNEWALL et al., 1999).

### **2.3 Nomenclatura e Classificação Taxonômica**

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, uma reavaliação e reclassificação Taxonômica de agentes foi iniciada. Frequentemente, seqüências gênicas de pequenas porções do genoma são utilizadas para mudanças taxonômicas

prematuras, negligenciando a Taxonomia Polifásica, a qual deveria também considerar as características fenotípicas (UILENBERG et al., 2004). Assim, algumas modificações recentes de membros da Família Anaplasmataceae, descritas por DUMLER et al. (2001), devem ser analisadas com certa cautela, pois algumas diversidades em outras seqüências poderiam não justificar tais reclassificações. Deveria ser realizada uma abordagem cautelosa e balanceada para a Taxonomia, levando em consideração informações genotípicas moleculares, a mais extensa possível para diferentes genes, como também para características fenotípicas (UILENBERG et al., 2004).

## **2.4 Diagnóstico e Caracterização Molecular**

O desenvolvimento da reação em cadeia pela polimerase levou a um avanço na detecção de DNA de material colhido “in vivo” e de cultivo celular (DALY e DOYLE, 2003). Essa técnica, entretanto, não é isenta de falhas. Por exemplo, a presença de moléculas inibidoras em uma reação de PCR pode suprimir a atividade da enzima Taq polimerase e, conseqüentemente, a amplificação de DNA, levando a resultados falso-negativos (BARBER et al., 1999).

Essas técnicas moleculares estão sendo aperfeiçoadas para se obter maior sensibilidade. Dessa forma, a hibridização de DNA com sondas específicas pode incrementar os resultados da PCR (GALE et al., 1996). A PCR-ELISA atualmente tem se mostrado bastante sensível na detecção de agentes infecciosos, como as leishmanioses cutânea e visceral, visto que a técnica da PCR isolada apresentava baixa sensibilidade. MARTÍN-SÁNCHEZ et al. (2002) em pesquisa de quinze amostras positivas na PCR-ELISA, observaram que apenas cinco (28%) foram positivas pelas técnicas convencionais. Essas técnicas associadas mostraram-se também bastante sensíveis e específicas para o diagnóstico de herpes-vírus eqüino (DALY e DOYLE, 2003). BARBER et al. (1999) utilizaram a PCR-ELISA para quantificar DNA de citomegalovírus (HCMV) em seres humanos.

A utilização de oligonucleotídeos universais de amplo espectro, associada ao seqüenciamento, permite a identificação de novos patógenos, anteriormente não



caracterizados, e é especialmente útil para caracterizar organismos fastidiosos ou não-cultiváveis, como as riquetsias (ANDERSON et al., 1991). Porém, em decorrência do amplo espectro de amplificação desses oligonucleotídeos, alguns cuidados devem ser tomados para se evitar contaminações com material genômico bacteriano indesejável. Erros de incorporação da enzima Taq DNA polimerase também podem se tornar problemas.

O seqüenciamento do gene RNA ribossomal (rRNA) deve ser feito com cuidado em todo o seu comprimento e em duplicata, pois pequenas diferenças (> 0,5 % para o Gênero *Ehrlichia*) são significantes para a espécie. Isso porque o gene 16S rRNA é altamente conservado e apresenta mutações fixadas em baixas frequências (ANDERSON et al., 1991). A seqüência de pequenas subunidades do rRNA varia de uma maneira ordenada entre linhagens filogenéticas e contém segmentos que são conservados nas espécies, gêneros e ao nível de Reino (WILSON et al., 1990). A reação de Seqüenciamento é também muito importante quando há problema na identificação morfológica, como em citologia do sangue e em problemas de especificidade, quando oligonucleotídeos iniciadores baseados em pequenas subunidades de RNA ribossomal, como o 16S rRNA, anelam em amostras com outros agentes erliquiais presentes (HANCOCK et al., 2001).

Atualmente, vários genes erliquiais estão sendo seqüenciados, como o gene que codifica a enzima Citrato Sintetase (gltA), gene groESL e genes que codificam proteínas de superfície (DUMLER et al., 2001; INOKUMA et al., 2001). O gene que codifica uma proteína externa de membrana (“Major Surface Protein”) do *A. phagocytophilum*, denominada msp-2, foi utilizado para a caracterização molecular das espécies detectadas desse agente em carrapatos Ixodídeos em Portugal (SANTOS et al., 2004). Na África, SARIH et al. (2005) utilizaram gene 16S rRNA para detecção e identificação de membros da Família Anaplasmataceae em carrapatos.

## **2.5 Genes específicos para Análise Filogenética**

Para inferir relacionamentos entre organismos, alguns requerimentos são importantes para a filogenia molecular (WISCONSIN STATE UNIVERSITY-Microtextbook)

- O gene deverá estar em todos os organismos estudados. Assim, funções celulares centrais (universais) devem ser procuradas para a escolha do gene a ser pesquisado. Genes de produtos de função na replicação, transcrição ou translação são os de escolha;

- Ausência de transferência lateral, isto é, o gene não deve estar sujeito à transferência entre espécies (lateral), pois, ao ser transferido, a história do gene não será a mesma história do organismo;

- Nível de conservação adequado na seqüência para as divergências de interesse. Porém, se o gene apresentar pouca mudança, isto é, muito conservado, poderá haver pouca ou nenhuma mudança entre os ramos evolucionários de interesse e, sendo assim, não será possível inferir relacionamentos próximos aos níveis de gênero e espécie;

- O tamanho do gene de interesse deve ser suficientemente grande para que contenha registro de informação histórica. Os genes de transferência de RNA (tRNA) estão presentes em todas as espécies, porém são muito pequenos (aproximadamente 75 nucleotídeos) para poder fornecer uma amostra acurada de evolução histórica.

Os genes rRNA são conservados através de bilhões de anos de divergência evolucionária. Por isso são normalmente utilizados para estudo de relacionamento entre seres vivos (WOESE e FOX, 1977). O nome dos genes ribossomais (5S, 16S e 23S) é baseado no coeficiente de sedimentação da molécula em água, e o valor numérico menor indica também uma molécula menor. O gene 5S apresenta 120 nucleotídeos e, aproximadamente, 1.500 e 2.900 nucleotídeos para o 16S e 23S, respectivamente. O gene 16S rRNA apresenta uma conservação extraordinária de alguns segmentos, e isso pode ser observado em diversos seres vivos. Assim, por exemplo, comparando-se determinado fragmento do gene do ser humano, do milho, de alguns fungos e da *Escherichia coli*, estes são completamente idênticos. Atualmente são mais de 10.000 seqüências acumuladas de 16S rRNA e constituem o maior campo de dados

disponíveis para inferir relacionamentos entre organismos. Por meio da comparação de seqüências de rRNA é possível estimar a ordem de ramificação histórica das espécies e também o número total de mudanças nas seqüências. CARL WOESE iniciou a montagem de dados de 16S rRNA na metade da década de 70. O rRNA foi o escolhido como a molécula de comparação, por ter função antiga e essencial na economia celular e interações com muitos outros RNA celulares co-envolvidos e proteínas (DOOLITTLE, 1999). O gene mais amplamente utilizado em estudos filogenéticos é o 16S rRNA. Embora seqüências do gene 16S rRNA possam ser usadas rotineiramente para diferenciar e estabelecer relacionamento entre gêneros e espécies bem definidas, espécies que recentemente divergiram podem não ser reconhecidas (FOX et al., 1992).

Também, para a realização de seqüenciamento, é fundamental que os produtos da PCR estejam purificados adequadamente de “primers/dimers” e nucleotídeos, antes de serem usados como amostras para reações de seqüenciamento (HIGGINS et al., 1995). O aumento da disponibilidade de informações em seqüências gênicas conservadas, quando combinado com a análise com endonucleases de restrição e seqüenciamento direto dos “alvos” amplificados, criou um novo acesso na identificação dos agentes infecciosos transmitidos por carrapatos (HIGGINS et al., 1995). Em um estudo filogenético, realizado por WHITFIELD e CAMERON (1998), o gene 16S mostrou-se mais informativo para a análise filogenética em dois níveis diferentes: entre espécies proximamente relacionadas ou populações, e entre Tribos, Subfamílias e Famílias.

A identificação seguida por seqüenciamento usando o gene 16S rRNA também tem sido utilizada para diagnóstico de outros agentes erliquiais. MARTIN et al. (2005) identificaram a presença do agente *A. platys* em cães de rua, naturalmente infectados, na Austrália. No Japão, MURAMATSU et al. (2005) identificaram a presença de *Ehrlichia* spp em pequenos roedores. Variantes genéticas do agente *A. phagocytophilum* infectantes de cães no Estado de Washington, nos Estados Unidos, foram identificadas através da PCR seguida de seqüenciamento (POITOUT et al., 2005). A infecção por *Anaplasma* spp também foi identificada em um cão da Colúmbia Britânica e, através da PCR seguida de seqüenciamento, observou-se uma similaridade

de 100% com seqüências de *A. phagocytophilum* depositadas no Genbank (LESTER et al., 2005). Análise filogenética através da reação da PCR em Tempo Real (“Real Time PCR”), identificou e demonstrou pela primeira vez a presença de *E. chaffeensis*, com uma similaridade de 100%, em amostras encontradas em carrapatos *Haemophysalis longicornis* na Coréia (LEE et al., 2005).

A detecção, seguida de identificação molecular de agentes da Família Anaplasmataceae encontrados em animais silvestres (DUGAN et al., 2005), também auxiliará na compreensão da epidemiologia da doença, como também na identificação de reservatórios importantes para espécies com potencial mórbido para seres humanos e animais domésticos.

No Brasil, a identificação molecular de *E. chaffeensis* em cervídeos, confirmada por seqüenciamento (MACHADO et al., 2006), demonstra a necessidade de maiores avaliações epidemiológicas de animais silvestres da fauna brasileira nas infecções erliquiais, que poderão vir a ser de maior importância para a Saúde Pública nos próximos anos.

Uma abordagem para a identificação de regiões internas de genes ribossomais, denominados de espaçadores transcritos internos (ITS), permite a análise dessas regiões localizadas entre os genes 16S e 23S da maioria dos RNA ribossomais. Essas regiões são mais variáveis que os genes ribossomais adjacentes e consistem em seqüências de DNA alinhados e conservados, encontrados em todas as amostras de uma única espécie, porém raramente entre gêneros ou Famílias, combinadas com as seqüências de DNA hipervariável (insertos ou deleções). Tais seqüências podem ser utilizadas na identificação de espécies muito precisas, enquanto as regiões hipervariáveis, com freqüência, permitem a caracterização de cepas. O banco de dados dessas regiões espaçadoras é denominado de “Ribosomal Intergenic Spacer Sequence Collection” (RISSC) (GARCIA-MARTINEZ et al., 2001). O uso de digitais (“fingerprintings”) de oligonucleotídeos de genes rRNA (“OFRG”), permitiu uma identificação de genes rRNA marcados com sondas, através de uma série de hibridizações com pequenas sondas de DNA. Por intermédio de uma análise eletroforética em gel de gradiente denaturante, foi possível realizar a comparação dos

“OFRGs” obtidos, permitindo uma identificação e análise de comunidades fúngicas e bacterianas (VALINSKY et al., 2002a; VALINSKY et al., 2002b). A descrição de seqüências completas do genoma de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* e *N. sennetsu*, como também seqüenciamento de diversos genes codificadores de diversas proteínas, ou relativos ao metabolismo do patógeno, auxiliarão na comparação e identificação de agentes encontrados em diferentes espécies animais e seres humanos em todo o mundo (HOTOPP et al., 2006).

## **2.6 Filogenia Molecular**

### **2.6.1 Reação de Seqüenciamento**

Em uma reação de seqüenciamento, a amostra de DNA-molde é adicionada à enzima polimerase, tampão, deoxinucleotídeos e deoxinucleotídeos marcados dideoxi. São realizadas reações térmicas em termociclador para hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores e extensão do produto. Os fragmentos formados com os dideoxinucleotídeos nas terminações, quando submetidos a eletroforese através de um método em capilares com polímeros no seqüenciador, separam-se de acordo com os tamanhos moleculares. O amplímero-marcado formado passa por uma janela de detecção no final do capilar, onde os marcadores são estimulados com um feixe de Raio-Laser, e emitirão luz a um comprimento de onda específico para cada terminação. Essa luz emitida é detectada, e os dados são, então, enviados para um computador acoplado ao seqüenciador, que analisa esses sinais e gera os dados da seqüência lida, criando uma figura gráfica, denominada de eletroferograma. Os “dados brutos”, isto é, os dados que saem do seqüenciador sofrem processo de leitura denominada de “Base Calling”. Nesse processo, há leitura dos dados do seqüenciador e identificação da seqüência de DNA gerada, atribuindo um valor de qualidade para cada posição nucleotídica identificada. Normalmente, cada seqüenciador tem o seu próprio programa de “Base Calling”, sendo o PHRED o mais utilizado. (PRODOSCINI et al., 2002). As

seqüências normalmente são gravadas em arquivos em modo FASTA, sem espaços e intervalos, que poderão ser utilizadas posteriormente para programas de alinhamentos.

### **2.6.2 Bioinformática**

A Bioinformática é uma ciência que envolve a união de diversas linhas de conhecimento: a engenharia de “softwares”, a matemática, a estatística, a ciência da computação e a biologia molecular. A estrutura química do DNA foi descrita por WATSON e CRICK, em 1953 e, desde então, vários métodos de análise desses polímeros foram descritos, permitindo a investigação de suas seqüências monoméricas constituintes. Atualmente, mais de 18 milhões de seqüências já foram produzidas e disponibilizadas em Bancos de Dados. Com o crescimento de número de informações de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos produzidos, o uso de Banco de Dados tem crescido na Bioinformática.

Bancos de Dados primários são aqueles que recebem seqüências de nucleotídeos, aminoácidos ou estruturas protéicas sem qualquer processamento ou análise, sendo os principais o GenBank, Instituto de Bioinformática Europeu (EBI), Banco de dados do Japão (DDJB) e Banco de Dados de Proteínas (PDB) (PRODOSCINI et al., 2002). O alinhamento de seqüências é uma das operações mais importantes da Bioinformática. Por meio do alinhamento, procura-se determinar o grau de similaridade entre duas ou mais seqüências, ou a similaridade desses fragmentos com mais de duas seqüências (Alinhamento Múltiplo). O alinhamento indica o grau de similaridade entre seqüências e não a homologia entres elas. Para alinhamento de seqüências, vários programas podem ser utilizados, entre eles o Clustal-X, Multialign ([http:// prodes.toulouse.inra.fr/multialign/multialign.html](http://prodes.toulouse.inra.fr/multialign/multialign.html)), Fasta e o Blast-2-sequences. A qualidade de um alinhamento é determinada pela soma dos pontos obtidos por cada unidade pareada (“match”) menos as penalidades pela introdução de “gaps” e posições não-pareadas (“mismatch”).

No Alinhamento Global, as seqüências são alinhadas de um extremo a outro, originando apenas um resultado. É usado para determinar regiões mais conservadas de

seqüências homólogas. Para esse tipo de alinhamento, utilizam-se com maior frequência os programas Clustal-w ([http:// www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html)) e Multialign.

No Alinhamento Local, as seqüências são alinhadas apenas nas regiões mais conservadas, independente da localização relativa de cada região em sua seqüência. Assim, o resultado desse tipo de alinhamento é o de uma ou mais regiões conservadas entre as seqüências. Esse tipo de alinhamento é usado na busca de seqüências homólogas ou análogas em uma Banco de dados. O mais conhecido e utilizado é o BLAST (PRODOSCINI et al., 2002).

### **2.6.3 GenBank**

O GenBank<sup>®</sup> é um Banco Público de Dados primários que contém milhares de seqüências de proteínas e nucleotídeos conhecidos, com suporte bibliográfico e anotações biológicas, construído e distribuído pelo Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI), uma divisão da Biblioteca Nacional de Medicina (NLM), localizada no campus do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) (BENSON et al., 2002). Os dados do GenBank são acessíveis pelo NCBI, ENTREZ, os quais integram dados às maiores fontes de seqüências de proteínas e DNA. O GenBank recebe mais de 100.000 seqüências de organismos distintos a cada ano. As seqüências pesquisadas no GenBank podem ser arquivadas e salvas em modo FASTA. As similaridades de seqüência são pesquisadas pelos programas de Famílias, denominados de Blast. O ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) é um sistema de Banco de Dados Integrado, que acessa dados de seqüências de DNA e proteínas, dados de mapas genômicos, populações, taxonomia, estruturas protéicas do banco de dados de modelo molecular (“Molecular Modeling DataBase-MMDB”) e referências via PubMed (Medline) (BENSON et al., 2002). Um número identificador (GI) é fornecido juntamente com o número de acesso da seqüência que é submetida ao Banco de Dados do GenBank. Esse GI sofre alteração toda vez que há uma mudança realizada na seqüência depositada. Para o envio de poucas seqüências, utiliza-se normalmente o

acesso pelo Bankit; entretanto, para o envio de várias seqüências, utiliza-se o acesso pelo Sequin, ambos localizados na página do GenBank.

#### **2.6.4 BLAST**

O programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) é utilizado para localizar bons alinhamentos entre uma seqüência de interesse pesquisada e dados existentes publicados no GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast>) (BENSON et al., 2002). Com a análise de similaridade entre as seqüências comparadas, pode-se verificar a qualidade de um alinhamento, que é indicada pelo valor denominado escore (S), no qual, quanto maior o S, melhor o alinhamento.

A significância estatística de um alinhamento é indicada pelo valor esperado (“e-value”) e, quanto menor o valor-e, mais significativa é o parâmetro obtido com as seqüências. Este valor diminui exponencialmente com o escore. Um valor-e próximo de zero indicaria que o alinhamento é significativo. Porém, ao serem utilizadas seqüências muito curtas, que podem ser “virtualmente idênticas”, o valor-e pode ser relativamente alto, pois o cálculo desse valor considera o comprimento da seqüência pesquisada.

O programa BLAST também apresenta diversos tipos de pesquisas: proteínas (BLAST-P), seqüências de nucleotídeos (BLAST-N) e interações proteínas “versus” nucleotídeos (BLAST-X; TB-BLAST-N e TB-BLAST-P) (BENSON et al., 2002).

#### **2.6.5 Clustal-X**

O Clustal-X<sup>®</sup> é um programa que permite o alinhamento múltiplo de seqüências, de fácil manuseio, e que fornece um sistema integrado das seqüências, bem como o perfil de alinhamento para análise dos resultados. Esse programa possui uma interface gráfica, em que os alinhamentos podem ser visualizados de maneira fácil e alterados, se necessário (THOMPSON et al., 1997). O Clustal é um dos programas mais utilizados nos trabalhos conduzidos com alinhamento múltiplo de seqüências. Para a análise de similaridades e filogenia de seqüência simples, isto é, sem vetores agrupados, podem-



se utilizar as seqüências diretamente do modo FASTA para o uso em programas de alinhamento. Porém, quando há necessidade de retirar ou ignorar tais seqüências agregadas, um programa de montagem deverá ser utilizado, como o PHRAD (“Phragment Assembly Program”) (PRODOSCINI et al., 2002).

### **2.6.6 Filogenia**

Pode-se definir, em primeiro lugar, o termo filogenia como o conjunto de história de ancestralidade entre todas as espécies. Em segundo lugar, denomina-se filogenia o diagrama que representa essa história. O termo Táxon é definido como qualquer classe cujos elementos são organismos reunidos com base em semelhanças, seja uma espécie, uma parte de uma espécie (uma população ou subespécie) ou um agrupamento de espécies (um grupo supra-específico). Qualquer diagrama ramificado que conecta espécies é um dendograma (Diagrama Filogenético). Um cladograma é um dendograma que expressa relações filogenéticas (ou genealógicas) apenas entre táxons terminais (espécies ou grupos supra-específicos). Assim, nos cladogramas, as conexões entre as espécies indicam apenas que há uma história comum ancestral. Entretanto, uma árvore filogenética é um dendograma que expressa relações filogenéticas, tanto entre táxons terminais quanto entre espécies ancestrais e espécies descendentes. Dessa forma, as árvores filogenéticas contêm mais afirmações que os cladogramas e correspondem a hipóteses mais complexas (AMORIN, 2002).

### **2.6.7 Árvores Filogenéticas**

Árvores Filogenéticas são gráficos que ilustram as relações evolutivas entre organismos individuais ou em grupos. Uma árvore filogenética é composta de nós e galhos ou ramos. Cada galho ou ramo conecta nós adjacentes. Os nós são as unidades taxonômicas, e os galhos ou ramos representam as relações entre essas unidades em termos da descendência ou ancestralidade. Assim, Topologia é o padrão de ramificação, e a análise da topologia de uma árvore filogenética é o estudo desse

padrão de ramificação encontrado. O tamanho dos galhos ou ramos representa o número de mudanças que ocorrem em relação ao último nó. As unidades taxonômicas, representadas pelos nós, podem ser espécies, populações, indivíduos, proteínas ou genes. Os nós internos de uma árvore filogenética representam as unidades ancestrais, e os nós externos, as unidades taxonômicas que estão sendo comparadas, também denominadas de Unidades Taxonômicas Operacionais - OTUs (“Operational Taxonomic Units”) (GRAUR e LI, 1999).

Para a geração de árvores filogenéticas utilizam-se métodos de distância: Distância-P; Jukes -Cantor; Kimura-2 parâmetros; Tajima e Nei; Tamura -3 parâmetros; Gama Poison, ou Métodos de Caracteres Discretos: Máxima Parcimônia (MP); Máxima Verossimilhança (MV). O MP baseia-se na teoria de que a melhor hipótese para explicar um processo é aquela que requer menor número de passos. Nesse processo, a árvore é gerada diretamente com os dados do alinhamento. Esse método faz uma exaustiva busca, pelo qual o programa utilizado no computador reconstrói todas as árvores possíveis e escolhe aquelas com número mínimo de mudanças, denominadas árvores parcimoniosas. O MV faz a reconstrução pela busca de uma árvore que maximize a probabilidade dos dados observados.

Para a reconstrução gênica utilizam-se algoritmos, como UPMGA (“Underweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means”) e “Neighbor-Joining” (NJ). Esses algoritmos realizam vários cálculos com a matriz de distância gerada a partir do alinhamento, para estimar a árvore filogenética. O “agrupamento entre vizinhos” ou NJ é o algoritmo mais utilizado e faz parte do grupo de métodos de evolução mínima, em que a árvore com a menor soma dos ramos é procurada.

Cada vez que um programa de filogenia molecular é rodado para gerar uma árvore sobre um conjunto de dados escolhidos, pode haver resultados diferentes. Um teste estatístico de confiança em topologia bastante utilizado é o de “bootstrap”, uma técnica bastante simples de reamostragem com reposição dos dados com o mesmo número total de bases (ou aminoácidos), em que cada sítio tem a mesma probabilidade de ser mostrado. Esse método gera vários conjuntos aleatórios dos dados obtidos e

estima, a partir deles, uma árvore. Todas as árvores são então analisadas, sendo escolhida aquela com maior probabilidade de ocorrência.

### **2.6.8 Programa de Análise Genética Evolucionária Molecular - MEGA-2**

O Programa de Análise Genética Evolucionária Molecular-MEGA (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software”) é um programa desenvolvido para explorar e analisar o alinhamento de DNA ou seqüências de proteínas sob uma perspectiva evolucionária. Esse programa pode receber dados diretamente salvos no programa Clustal, realizar as análises e, então, construir a árvore filogenética (KUMAR et al., 2001).

No programa de construção de árvore filogenética MEGA, o “bootstrap” proporciona as porcentagens com que cada agrupamento apareceu nas replicações. Essa técnica revela a consistência interna dos dados, ou seja, se a topologia muda com a reamostragem dos dados, menor é o valor da proporção do “bootstrap” e, portanto, menor será a segurança que se pode ter na topologia gerada. Métodos analíticos também são incluídos para estimar o erro-padrão.

Esse programa também apresenta um explorador de matriz de distância, para mostrar as distâncias pareadas com seus erros-padrões estimados. O Método de “Neighbor-Joining” é um método proposto para reconstruir árvores filogenéticas a partir de dados de distância evolucionária, e pode ser utilizado pelo programa Mega. O princípio desse método é encontrar pares de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), os denominados “vizinhos” (“neighbor”), que minimizam o comprimento total do ramo/galho, a cada estágio de clusterização das OTUs, iniciando com uma árvore semelhante à estrela. Esse método não produz necessariamente uma árvore de evolução mínima, mas simulações computacionais mostram que é muito eficiente na obtenção da árvore de topologia correta. O algoritmo de NJ é similar ao Método de Stach-Tversky (ST), o qual objetiva construir a topologia de uma árvore. Porém, difere deste último porque fornece não apenas a topologia, mas também o comprimento dos ramos da árvore final. Complementando, um par de vizinhos é o mesmo que um par de

OTUs conectados por um único nó interno em uma árvore bifurcante sem raiz. Esse método define a topologia de uma árvore por meio de sucessivas aproximações de pares de vizinhos e produção de novos pares. Geralmente, não se sabe quais são os pares de OTUs que são vizinhos verdadeiros, porém, por meio da soma dos comprimentos dos ramos (braços) que é computada para todos os pares de OTUs, é escolhido o par de menor valor de soma, que é então inferido como o “par de vizinhos”, gerando a árvore.

Assim, como mais genomas tornam-se disponíveis a cada dia, o campo da classificação filogenética continuará a evoluir, e um melhor entendimento da evolução será alcançado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar molecularmente espécies da Família Anaplasmataceae encontradas em células leucocitárias granulocíticas, monocíticas e plaquetas de cães atendidos nos Hospitais Veterinários da Universidade Estadual Paulista-Unesp, Campus de Jaboticabal-SP e Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal-UNIDERP, Campo Grande-MS.

#### 3.2 Objetivos Específicos

**3.2.1** Detectar e identificar a presença de material genômico de agentes da Família Anaplasmataceae em cães que apresentavam inclusões citoplasmáticas sugestivas com infecção por *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* e *Neorickettsia risticii*;

**3.2.2** Realizar, por meio da utilização de técnicas de seqüenciamento de um fragmento de ~691 pares de base do gene 16S rRNA, a caracterização parcial do fragmento de *Ehrlichia* spp da amostra-padrão de Jaboticabal, e de outras amostras com inclusões encontradas neste estudo;

**3.2.3** Realizar, por meio da utilização de técnicas de seqüenciamento de um fragmento de ~930-932 pares de base do gene 16S rRNA, a caracterização parcial do fragmento de amostras do genogrupo-*Anaplasma phagocytophilum* deste estudo;

**3.2.4** Comparar as seqüências dos fragmentos obtidos com as seqüências apresentadas previamente no GenBank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); (BENSON et al., 2002) por intermédio do programa BLAST e também realizar estudos filogenéticos das seqüências encontradas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Seleção das amostras experimentais**

Como critério de inclusão dos cães no protocolo experimental, utilizou-se a detecção microscópica de inclusões citoplasmáticas e/ou mórulas em leucócitos e plaquetas, sugestivas de infecção por agentes da Família Anaplasmataceae, pertencentes aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Vinte e cinco amostras foram provenientes de cães atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista-FCAV-Unesp, Campus de Jaboticabal-SP, e trinta do Hospital Veterinário da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal- UNIDERP, Campo Grande-MS.

### **4.2 Colheita das amostras**

De cada animal foram colhidos, assepticamente, 10 mL de sangue com anticoagulante EDTA. Cada amostra foi dividida em duas partes, sendo uma alíquota colocada em tubos de polipropileno estéreis de 2,0 mL, devidamente identificados, sendo mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração de material genômico para os experimentos da PCR. A outra alíquota foi utilizada para a realização de esfregaço sangüíneo proveniente da papa de leucócitos.

Todo o material colhido foi processado no laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp de Jaboticabal.

### **4.3 Exames Citológicos**

#### **4.3.1 Esfregaço Sangüíneo de Papa de Leucócitos**

Cada amostra de sangue com EDTA foi submetida à centrifugação, aproximadamente a  $870 \times g$ , por 10 minutos, para separação da camada plasmática da

papa leucocitária (“Buffy Coat”) associada à plaquetária e papa eritrocitária. Foi então realizado esfregaço sangüíneo delgado da camada leucocitária, fixado em álcool metílico por 3 minutos e seco à temperatura ambiente. A coloração do esfregaço foi realizada pelo corante Giemsa (Apêndice). Para cada animal foram confeccionadas quatro lâminas, as quais foram lidas em microscopia óptica de luz, observando-se em torno de 400 leucócitos totais e, aproximadamente 200 plaquetas por lâmina.

As inclusões citoplasmáticas encontradas em leucócitos e em plaquetas foram fotografadas em câmera digital e arquivadas, utilizando-se Microscópio Olympus Optical Co. (modelo U-MDO10B) com o software Image Pró-Plus™ (Apêndice).

#### **4.4 Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

##### **4.4. 1 Obtenção dos controles positivos**

Foi utilizada amostra de controle positivo para *Ehrlichia canis* referente à amostra-padrão de Jaboticabal, isolada em 1993 por MACHADO (CASTRO et al., 2004).

Controles positivos do agente da anaplasmoze granulocítica humana (HGA/*Anaplasma phagocytophilum*/*Ehrlichia equi*), *E. chaffeensis*, *N. risticii* e *N. sennetsu* foram gentilmente cedidos pelo Dr. J. Steve Dumler, do John Hopkins Hospital- Mariland-Estados Unidos. Essas amostras eram oriundas de material de cultivo celular, previamente preparadas por extração de DNA e liofilizadas.

O controle positivo para o agente *Anaplasma platys* foi obtido das amostras de Campo Grande, gentilmente cedidas pela Dra. Alda Isabel Souza, enviado como sangue total com EDTA resfriado a 4°C.

##### **4. 4. 2 Extração do material genômico (DNA)**

O material genômico (DNA total) presente em cada amostra foi extraído a partir de uma alíquota de 200µL de sangue com EDTA congelado (-20°C), utilizando-se o QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen™), de acordo com as especificações do fabricante

(Apêndice). O DNA extraído foi colocado em alíquotas em tubos de polipropileno de 0,6mL estéreis, identificados e armazenados a -20° C, para utilização na PCR.

#### **4.4.3 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores**

A avaliação das características de todos os oligonucleotídeos iniciadores escolhidos foi realizada por meio da análise pelo programa Gene Runner (Versão 3.1- Copyright 1994<sup>©</sup> Hastings Programs, Inc.).

##### **4. 4.3.1 Espécie *Ehrlichia canis***

Para a PCR do Gênero *Ehrlichia*, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são denominados ECC (senso ou “forward”) e ECB (anti-senso ou “reverse”) derivados do gene 16S rRNA, os quais amplificam todas as *Ehrlichia* spp (DAWSON et al., 1994; PERSING, 1996; WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998) e fornecem um amplímero de aproximadamente 478 pares de bases. As seqüências desses oligonucleotídeos iniciadores são: ECC (5'-aga acg aac gct ggc ggc aag c-3') e ECB (5'-cgt att acc gcg gct gct ggc a-3') (Tabela 1).

Após a PCR do Gênero com ECC/ECB, foi realizada uma nPCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores derivados do gene 16S rRNA denominados “canis” (5'-caa tta ttt ata gcc tct ggc tat agg a-3') e GA1UR (5'-gac ttt gcc ggg act tct tct-3') (WANER e DAWSON, 1996; KOCAN et al., 2000), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 358 pares de bases (Tabela 1).

##### **4.4.3.2 Espécie *Ehrlichia chaffeensis***

Após a PCR do Gênero com ECC/ECB, foi realizada uma nPCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores “chaff” (HE-1) (5'-caa ttg ctt ata acc ttt tgg tta taa at -3') e GA1UR (5'-gac ttt gcc ggg act tct tct-3') (WANER e DAWSON, 1996; KOCAN et al., 2000), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 410 pares de bases. (Tabela 1).



#### 4.4.3.3 Membros do Genogrupo -*Anaplasma phagocytophilum*

Para a PCR de membros do genogrupo da *A. phagocytophilum*, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram gE3A (5'-cac atg caa gtc gaa cgg att att c-3') e gE10R (5'-ttc cgt taa gaa gga tct aat ctc c-3') (MASSUNG et al., 1998), os quais amplificam um amplicómero de aproximadamente 930-932 pares de bases (Tabela 1).

Na nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores gE9F (5'-aac gga tta ttc ttt ata gct tgc t-3') e g2 (5'-ggc agt att aaa agc agc tcc agg-3') (MASSUNG et al., 1998), os quais amplificam um amplicómero de aproximadamente 546 pares de bases (Tabela 1).

#### 4.4.3.4 Espécie *Anaplasma platys*

Para a PCR de *Anaplasma platys*, foram utilizados na PCR os oligonucleotídeos iniciadores denominados Platys -F (5'-aag tcg aac gga ttt ttg tc-3') com Platys-R (5'-ctt taa ctt acc gaa cc-3'), os quais amplificam um amplicómero de aproximadamente 503 pares de bases (INOKUMA et al., 2002) (Tabela 1).

#### 4.4.3.5 Espécie *Ehrlichia ewingii*

Para a PCR de *Ehrlichia ewingii*, foram utilizados, na primeira etapa da PCR, os oligonucleotídeos iniciadores denominados 8F (5'-agt ttg atc atg gct cag-3') com 1448R (5'-cca tgg cgt gac ggg cag tgt g-3'), os quais amplificam um amplicómero de aproximadamente 1.440 pares de bases (PERSING, 1996) (Tabela 1).

Na nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores "ewingii" (5'-caattcctaaatagtctctgactatt-3') e GA1UR (5'-gac ttt gcc ggg act tct tct-3'), os quais amplificam um amplicómero de aproximadamente 412 pares de bases (PERSING, 1996) (Tabela 1).

#### 4.4.3.6 Espécie *Anaplasma phagocytophilum* – gene 16S rRNA

Para a primeira etapa da amplificação, foram utilizados na PCR os oligonucleotídeos iniciadores denominados 8F (5'-agt ttg atc atg gct cag-3') com 1448R

(5'-cca tgg cgt gac ggg cag tgt g-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 1.440 pares de bases (PERSING, 1996) (Tabela 1).

Na nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores "equi" (5'-ttattcttatagcttgctataaag-3') e GA1UR (5'-gac ttt gcc ggg act tct tct-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 406 pares de bases (PERSING, 1996) (Tabela 1).

#### **4.4.3.7 Espécie *Anaplasma phagocytophilum* – gene msp2**

Para a reação de PCR para o agente *Anaplasma phagocytophilum*, também foi utilizado um outro par de oligonucleotídeos iniciadores, derivados do gene que codifica a proteína principal de membrana 2 ("Major Surface Protein-2"- msp2), denominados msp 465F (5'-tga tgt tgt tac tgg aça ga-3') e msp 980R (5'-cac cta acc ttc ata aga a-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 550 pares de bases (CASPERSEN et al., 2002) (Tabela 1).

#### **4.4.3.8 Espécie *Neorickettsia risticii***

Para a PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores denominados ER3-F (5'-att tga gag ttt gat cct gg-3') com ER2-R (5'-gtt tta aat gca gtt ctt gg-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 599 pares de bases (CHAE et al., 2003) (Tabela 1).

Na nPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ER3a-F (5'-ctagcggtaggcttaac- 3') e ER2-R (5'-cac acc taa ctt acg gg-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 529 pares de bases (CHAE et al., 2003) (Tabela 1).

A reação de PCR/nPCR com estes oligonucleotídeos iniciadores acima também amplificou o DNA controle positivo do agente *N. sennettsu*, portanto, não foi realizada uma PCR específica para esse agente.

#### **4.4.3.9 Espécie *Babesia canis***

Para amplificação de *Babesia canis*, foram utilizados na PCR os oligonucleotídeos iniciadores denominados Piro-A (5'-aat acc caa tcc tga cac agg-3')

com Piro-B (5'-tta aat acg aat gcc ccc aac-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 400 pares de bases, derivado do gene 18S rRNA para todas as espécies (CARRET et al., 1999) (Tabela 1).

#### 4.4.3.10 PCR para obtenção de amplímeros para Seqüenciamento

Para a PCR de *Ehrlichia* spp, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores denominados 750-F (5'-tag tcc acg ctg taa acg-3') com EC3 (5'-acc cta gtc act aac cca ac-3'), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 691 pares de bases, derivado do gene 16S rRNA (UNVER et al., 2001).

Para a PCR de *Anaplasma* spp, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores gE3A (5'-cac atg caa gtc gaa cgg att att c-3') e gE10R (5'-ttc cgt taa gaa gga tct aat ctc c-3') (MASSUNG et al., 1998), os quais amplificam um amplímero de aproximadamente 930-932 pares de bases (Tabela 1).

#### 4.4.4 Amplificação pela técnica de PCR

Nas reações de PCR, foram utilizados 5 $\mu$ L de DNA-amostra (para reações de PCR que foram seguidas pela "nested" PCR) e 10 $\mu$ L de DNA-amostra (para reações de apenas uma etapa). Todos os oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen<sup>®</sup>) foram diluídos para ter uma concentração final de 20 pmol/ $\mu$ L, sendo utilizado 1 $\mu$ L em reação de volume final de 50 $\mu$ L. O Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub> -50 mM, Invitrogen<sup>®</sup>) foi utilizado na concentração de 1,5mM para todas as reações, exceto para a PCR de *A. platys* e de *N. risticii*, onde foi usado 1,6mM e 2,5 mM, respectivamente. O tampão da PCR (10mM Tris-Cl (ph=8,3), 50mM KCl) (Invitrogen<sup>®</sup>) foi usado sempre na concentração 1X, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM) (Invitrogen<sup>®</sup>) e 1,25U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen<sup>®</sup>), em um volume final completado com água ultra pura estéril de 50 $\mu$ L. Nas reações de nPCR, os reagentes foram utilizados nas mesmas concentrações e volumes utilizados na PCR, exceto o DNA (produto da primeira Etapa - PCR), o qual foi adicionado no volume de 1 $\mu$ L por reação, em um volume final de 50 $\mu$ L.

Para as reações de PCR com finalidade de extração dos amplicómeros para seqüenciamento, foi utilizada 1,25U da enzima Vent<sub>r</sub> DNA Polymerase (Biolabs™) com a substituição do MgCl<sub>2</sub> por MgSO<sub>4</sub>, de acordo com as especificações do fabricante, para uma reação de volume final de 50µL. Em cada reação foi utilizado controle positivo da espécie-alvo desejada e controles negativos da reação e da extração de DNA.

As seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (“Primers”) utilizados nas reações de PCR e “nested” PCR para detecção de *Anaplasmataceae*, tamanhos dos amplicómeros e referência de cada protocolo são listadas na tabela abaixo.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e “nested” PCR para agentes da Família Anaplasmataceae, com a descrição dos tamanhos dos amplicómeros e referência utilizada.

Agentes da Família Anaplasmataceae	Seqüência do Oligonucleotídeo (5' → 3')	Tamanho do Amplicómero (pb)	Referência
<i>Ehrlichia</i> spp			DAWSON et al., 1994; PERSING, 1996; MURPHY et al., 1998; KOCAN et al., 2000
- ECC	5'- aga acg aac gct ggc ggc aag cc - 3'	478	
- ECB	5'- cgt att acc gcg gct gct ggc - 3'		
<i>E. canis</i>			PERSING, 1996 KOCAN et al., 2000
- can	5'- caa tta ttt ata gcc tct ggc tat agg a - 3'	358	
- GAIUR	5'- gac ttt gcc ggg act tct tct - 3'		
<i>E. chaffeensis</i>			PERSING, 1996 KOCAN et al., 2000
- chaff	5'- caa ttg ctt ata acc ttt tgg tta taa at - 3'	410	
- GAIUR	5'- gac ttt gcc ggg act tct tct - 3'		
<i>E. ewingii</i>			PERSING, 1996
- 8 F	5'- agt ttg atc atg gct cag - 3'	1440	
- 1448 R	5'- cca tgg cgt gac ggg cag tgt g - 3'		
- ewingii	5'- caa ttc cta aat agt ctc tga cta tt -3'	412	
- GAIUR	5'- gac ttt gcc ggg act tct tct - 3'		
<i>Anaplasma platys</i>			INOKUMA et al., 2001
- Platys F	5'- aag tcg aac gga ttt ttg tc - 3'	504	
- Platys R	5'- ctt taa ctt acc gaa cc - 3'		

Continua...

## Continuação Tabela 1

<i>A. phagocytophilum</i> (Genogrupo)			MASSUNG et al., 1998
- gE3a	5' - cac atg caa gtc gaa cgg att att c - 3'	932	
- gE10R	5' - ttc cgt taa gaa gga tct aat ctc c - 3'		
- gE2	5' - ggc agt att aaa agc agc tcc agg - 3'	546	
- gE9F	5' - aac gga tta ttc ttt ata gct tgc t - 3'		
<i>A. phagocytophilum</i> (gene 16S rRNA)			
- 8 F			PERSING, 1996
- 1448 R	5' - agt ttg atc atg gct cag - 3'	1440	
- equi	5' - cca tgg cgt gac ggg cag tgt g - 3'		
- GAIUR	5' - tta ttc ttt ata gct tgc tat aaa g - 3'	406	
	5' - gac ttt gcc ggg act tct tct - 3'		
<i>A. phagocytophilum</i> (gene msp2)			
- MSP 465F	5' - tga tgt tgt tac tgg aca ga - 3'	550	CASPERSEN et al., 2002
- MSP 980R	5' - cac cta acc ttc ata aga a - 3'		
<i>Neorickettsia risticii</i>			
- ER3-F	5' - att tga gag ttt gat cct gg - 3'	599	CHAE et al., 2003
- ER2-R	5' - gtt tta aat gca gtt ctt gg - 3'		
- ER3a-F	5' - cta gcg gta ggc tta ac - 3'	529	
- ER2a-R	5' - cac acc taa ctt acg gg - 3'		
<i>Babesia canis</i> (gene 18S rRNA)			
- Piro A	5' - aat acc caa tcc tga cac agg g - 3'	400	CARRET et al., 1999
- Piro B	5' - tta aat acg aat gcc ccc aac - 3'		

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho Termociclador- DNA Engine Gradiente Cyler-Peltier Thermal Cyler-Modelo PTC-200 (MJ Reasearch™), com as seqüências térmicas abaixo:

Tabela 2. Descrição das seqüências térmicas e de tempo para as reações de PCR e “nested” PCR para agentes da Família Anaplasmataceae.

Reação Agente	Seqüências Térmicas
<b>PCR</b> <i>E. canis</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>E. canis</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>E. chaffeensis</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> <i>E. chaffeensis</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> Genogrupo <i>A. phagocytophilum</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b> Genogrupo <i>A. phagocytophilum</i>	94°C por 5 minutos 30 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>A. platys</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 90 segundos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b> <i>E. ewingii</i>	94°C por 5 minutos 40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 2 minutos a 72°C 72°C por 5 minutos

Continua...

## Continuação Tabela 2

<b>nPCR</b>	94°C por 5 minutos
<i>E. ewingii</i>	40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b>	94°C por 5 minutos
<i>A. phagocytophilum</i> gene 16S rRNA	40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 2 minutos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b>	94°C por 5 minutos
<i>A. phagocytophilum</i> gene 16S rRNA	40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b>	94°C por 2 minutos
<i>A. phagocytophilum</i> gene msp2	2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 30 segundos a 72°C 2 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b>	94°C por 5 minutos
<i>N. risticii</i> gene 16S rRNA	40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 2 minutos a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>nPCR</b>	94°C por 5 minutos
<i>N. risticii</i> gene 16S rRNA	40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos
<b>PCR</b>	94°C por 5 minutos
<i>B. canis</i> gene 18SrRNA	30 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos

As reações de amplificação para posterior reação de seqüenciamento foram realizadas em aparelho Termociclador- DNA Engine Gradiente Cyclor-Peltier Thermal Cyclor-Modelo PTC-200 (MJ Reasearch™), com as seqüências térmicas descritas abaixo.

Tabela 3. Descrição das seqüências térmicas e de tempo para as reações de PCR, seguida de reações de seqüenciamentos para agentes da Família Anaplasmataceae.

Reação	Seqüências Térmicas
<b>PCR</b>	94°C por 4 minutos
Seqüenciamento <i>Ehrlichia</i> spp (oligos 750F/EC3)	40 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 7 minutos
<b>PCR</b>	94°C por 5 minutos
Seqüenciamento <i>Anaplasma</i> spp (oligos gE3a/gE10R)	40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C 72°C por 5 minutos



#### **4.4.5 Detecção dos produtos amplificados (amplímeros)**

Todos os produtos amplificados gerados nas reações de PCR e nPCR foram visualizados após eletroforese em Gel de Agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) a 1,3% (Apêndice), corado com Brometo de Etídeo 0,01% (Invitrogen<sup>®</sup>), em cuba horizontal, com solução de TEB 1X (Apêndice) como fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e cinquenta minutos com fonte a 50mA e 100V. Na primeira canaleta de cada gel foi adicionado um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Invitrogen<sup>®</sup>).

#### **4.5 Reação de Seqüenciamento**

##### **4.5.1 Extração dos amplímeros do Gel de Agarose**

Após a reação de PCR com os oligos 750F/EC3 (691pb) e gE3a/Ge10R (~932pb), as bandas referentes a cada amplímero foram cortadas do gel de agarose com lâmina de bisturi estéril, pesadas e colocadas em tubos de polipropileno de 2,0mL devidamente identificados. Na seqüência, foi realizada extração do produto da PCR em gel de agarose, utilizando-se o QUIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen<sup>®</sup>), seguindo as instruções do fabricante (Apêndice).

##### **4.5.2 Quantificação de DNA dos amplímeros**

Cada amostra extraída do gel foi então submetida a uma nova eletroforese em gel de Agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) a 1,0% (Apêndice), corado com Brometo de Etídeo 0,01% (Invitrogen<sup>®</sup>), em cuba horizontal, com solução de TEB 1X (Apêndice) como fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e trinta minutos com fonte a 50mA e 100V. Um marcador de peso molecular (“Low DNA Mass Ladder”) (Invitrogen<sup>®</sup>) foi adicionado na primeira canaleta de cada gel analisado para se obter uma medida comparativa das quantidades de DNA das amostras. A proporção foi de 4 $\mu$ L de marcador ou de amostra para 2  $\mu$ L de tampão de amostra (Apêndice). Também foi realizada uma quantificação de material genômico total do produto amplificado em aparelho Bio-espectrofotômetro (Eppendorf<sup>®</sup>), por meio da leitura da absorbância individual de cada amostra amplificada em uma diluição prévia de 1:100 em água ultra-

pura estéril, e comparado com uma amostra branca composta apenas de água ultra pura estéril de leitura de valor 0,0 µg/mL. Cada concentração foi devidamente anotada para uso posterior na reação de seqüenciamento.

#### 4.5.3 Reação de Seqüenciamento

Os amplicons purificados e quantificados foram utilizados na concentração aproximada de 80-100 ng de DNA-amostra. Inicialmente em gelo, foi feito um mix da reação, composto de 3,5µL de Tampão "Save-Money" (MgCl<sub>2</sub> 1M; Tris-HCl 1M ph=9,0; água q.s.p.200mL), 0,5µL de "BigDye" (Big Dye<sup>r</sup>Terminator V3.1 9 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems<sup>TM</sup>) e 2µL do oligonucleotídeo iniciador-"forward" que originou o amplímero (a 5 pmol/µL). Utilizou-se uma placa de 96 cavidades (PP- PCR plate -Mil Halben Rand Für ABI, Greiner Bio-One<sup>TM</sup>) colocada em gelo, e a cada cavidade adicionou-se, inicialmente, 3µL de água ultra pura, 1µL da amostra a ser seqüenciada e 6µL 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.10µL). A placa foi então submetida à centrifugação (Centrifuga de placa modelo-Rotina 46R, Hettich-Zentrifuger<sup>TM</sup>) por 20 segundos, a 1.200 rpm, e depois a placa foi vedada com Tampa de Silicone e colocada em aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller - Peltier Effect Cycling Cyler, Modelo PTC-100, MJ Reasearch<sup>TM</sup>), com a programação de 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 52°C, 4 minutos a 60°C e, finalizando, a 4°C indefinidamente. Após essa etapa, foi adicionado 80µL de Isopropanol 75% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e incubada em centrifuga de placa (Rotina 46 R, Hettich-Zentrifuger<sup>TM</sup>) a 20°C por 15 minutos. Após essa pausa, a placa foi centrifugada a 20°C, em 4.000 rpm, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Adicionou-se 200µL de Etanol 70% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e centrifugada (Rotanta 46 R, Hettich-Zentrifuger<sup>TM</sup>) a 20°C, em 4.000 rpm, 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 46R, Hettich-Zentrifuger™) à temperatura ambiente em 4.000 rpm, por 20 segundos. Em seguida, a placa foi então colocada, sem tampa em uma bomba de alto vácuo (Eduards™) por 5 minutos. Adicionou-se 9 $\mu$ L de formamida (Hi Di, Applied Biosystems™) para cada amostra, vedou-se a placa com 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 aparelho termociclador, a placa foi colocada em gelo por 2 minutos. Após isto, a placa foi colocada no aparelho seqüenciador (3100 Hitachi Genetic Analyser - ABI PRISM, Applied Biosystems™).

As reações de seqüenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV- Unesp de Jaboticabal.

#### **4.6 Análise dos resultados obtidos no seqüenciamento**

A reação de seqüenciamento levou aproximadamente 2 horas, e as seqüências obtidas foram passadas automaticamente para um computador acoplado ao seqüenciador. Cada amostra foi então aberta individualmente, reclassificada e salva em arquivo do programa ABI3100 (Applied Biosystems™). Analisou-se o gráfico (eletroferograma) formado por cada amostra e foram selecionados aqueles com boa qualidade. Parâmetros, como sinais emitidos pelas bases (“Ave Signal Intensity”), intensidade e qualidade dos picos e presença de “n”s nas seqüências foram analisados para cada amostra. A visualização dos gráficos (eletroferograma) foi também realizada com auxílio do programa Chromas Lite (Version 2.0, Copyright© 1998-2004 Technelysium Pty Ltd). As seqüências de boa qualidade foram analisadas e confrontadas com seqüências já existentes publicadas no GenBank, e também pesquisadas por meio da verificação de similaridades pelo programa BLAST (BENSON et al., 2002). Foram escolhidas dez seqüências comuns a todas as amostras, considerando-se as porcentagens de identidades mais altas e valores-e menores (e-value, ideal=0). Todas as seqüências obtidas pelo seqüenciamento e as escolhidas pelo BLAST foram salvas em modo “FASTA”, para serem usadas na análise seguinte com o

programa Clustal-X (THOMPSON et al., 1997). Com esse programa foram obtidos parâmetros de alinhamento, múltiplos alinhamentos e alinhamentos completos. As seqüências foram então salvas em modo “.ALN” e foram utilizadas no Programa MEGA-2 (“Phylogenetic and molecular evolutionary analyses-MEGA version 2.1”) (KUMAR et al., 2001). As seqüências salvas foram convertidas em modo “.meg”, sendo feitos os cortes de fragmentos, que são pedaços desalinhados. O arquivo salvo foi então aberto pelo programa Mega, com o qual foram realizadas as formações de gráficos de filogenia (árvores filogenéticas). As seqüências alinhadas foram reamostradas com “bootstrap” de 1.000 e, com o método de construção da árvore “neighbor-joining”, e com o método de distância, Kimura-2-parâmetros, foi realizada a formação das árvores filogenéticas para as amostras provenientes de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores para os organismos pertencentes à Família Anaplasmataceae, ao Genogrupo *A. phagocytophilum* e a espécie *Babesia canis*.

As seqüências novas obtidas foram enviadas para o Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI), localizado no campus do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NJH), até posterior publicação.

#### **4.7 Reações de Digestão com Enzimas de Restrição**

Para confirmação da espécie e subespécie, os amplicómeros (400 pb) obtidos na reação de PCR para *Babesia* spp foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *Taq* I e *Hinf* I (CARRET et al., 1999). A enzima *Hinf* I cliva apenas a *Babesia canis rossi* em fragmentos de 227 e 174 pares de bases. E a enzima *Taq* I cliva apenas o amplicómero resultante da amplificação da *Babesia canis vogeli* em fragmentos de 26, 171 e 203 pares de bases (Apêndice).

Foram utilizadas enzimas de restrição para confirmação e diferenciação dos fragmentos (amplicómeros) obtidos na reação de PCR para o Genogrupo-*A. phagocytophilum* com os oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R (~930-932pb). As enzimas foram escolhidas utilizando-se seqüências conhecidas e previamente publicadas no GenBank para os produtos desses oligonucleotídeos iniciadores frente a

amostras publicadas para *A. platys* e para *A. phagocytophilum*. Por meio da análise dos fragmentos produzidos pelo alinhamento dos oligos pelo programa GeneRunner (Versão 3.1- Copyright 1994<sup>©</sup> Hastings Programs, Inc.), foram obtidas todas as enzimas que, possivelmente, clivariam ambos os fragmentos, e selecionou-se *Ava* I, *Eco* NI e *Bpm* I (Apêndice).

As reações de clivagem foram realizadas utilizando-se 14 $\mu$ L da amostra adicionada a 6 $\mu$ L de mix para cada enzima, composto de 10 U da enzima *Ava* I e *Eco* NI e 3U da *Bpm* I, Tampão respectivo de cada enzima 1X, BSA 1X adicionado somente no mix da *Bpm* I, e água ultra pura estéril para completar o volume final de 20 $\mu$ L. (Apêndice). Todas as amostras foram incubadas a 37°C em um Banho-seco (Boeckel Scientific<sup>TM</sup>) por uma hora e trinta minutos. Após a incubação, as amostras foram novamente submetidas à eletroforese em gel de Agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) a 1,3% (Apêndice), corado com Brometo de Etídeo 0,01% (Invitrogen<sup>®</sup>), em cuba horizontal, com solução de TEB 1X (Apêndice) como fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e cinquenta minutos, com fonte a 50mA e 100V. Um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Invitrogen<sup>®</sup>) foi adicionado na primeira canaleta de cada gel analisado, para se obter uma medida comparativa dos tamanhos dos produtos clivados.

A enzima *Ava* I não cliva o agente *A. phagocytophilum* mas cliva *A. platys* em dois fragmentos: 561 e 369; e a *Eco* NI cliva *A. phagocytophilum* e *A. platys* em dois fragmentos: 282 e 649, e 280 + 651. Apesar dessa última enzima clivar os dois agentes, essa clivagem auxilia na confirmação da especificidade do amplímero obtido.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Visualização e identificação das inclusões citoplasmáticas

Neste estudo, as inclusões citoplasmáticas, sugestivas de infecção por agentes da Família Anaplasmataceae, encontradas nas células sangüíneas leucocitárias e plaquetárias, apresentaram uma grande variedade de formas, intensidade de coloração e de tamanhos (Figura 1). Foram identificadas estruturas com formas que variaram de punctiformes (Figura 1: A, B, C, D e E), circulares (Figura 1: F, G, H, I, O, P, U, V e X), ovaladas (Figura 1: J, K, L, N e S), e sem forma definida (Figura 1: R e M), em decorrência do contato direto com os núcleos de algumas células hospedeiras. As estruturas menores com características punctiformes em grupos ou isoladas são sugestivas de serem os corpúsculos elementares erliquiais (Figura 2). Estruturas circulares menores são compatíveis com os denominados corpúsculos iniciais erliquiais (Figura 3), e estruturas maiores com aspecto de amora, compatíveis com as estruturas de mórulas erliquiais (Figura 4). Também foram encontradas formas erliquiais compatíveis com o agente *Anaplasma platys* (Figura 1: T, U, V e X), as quais foram visualizadas, na maioria das lâminas, como estruturas isoladas ou, menos freqüentemente, em duplas, com coloração em tons de púrpura. Em uma lâmina foi possível visualizar três mórulas infectando uma única plaqueta.

Também foram observadas variações de padrões de cores dessas estruturas, apesar de se ter utilizado o mesmo corante (Giemsa) e protocolo para a coloração dos esfregaços de papas leucocitárias. As inclusões apresentaram padrões basofílicos, isto é, mais azulados ou, em alguns casos, mais acidofílicos, em tons róseos. Porém, na maioria das lâminas estudadas, as inclusões de coloração azulada mais escurecida foram predominantes.

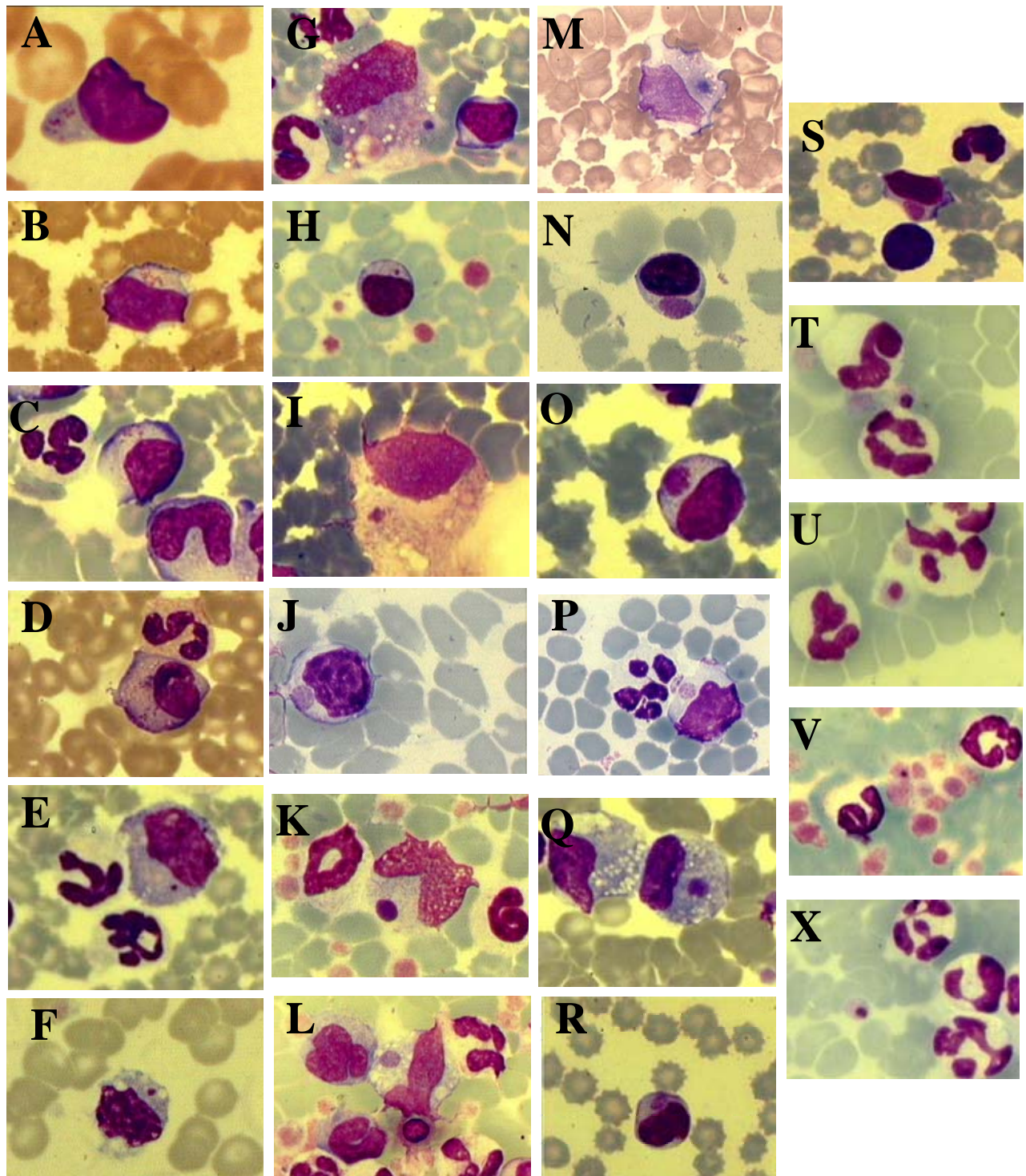


Figura 1. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para *E. canis* e/ou PCR para *A. platys*. Observar a grande variação na forma, coloração e tamanho das inclusões erliquiais. Fotos **A** a **D** com morfologia compatível com corpúsculos elementares; **E** a **I** com corpúsculos iniciais; **J** a **S** com mórulas de *E. canis*; e **T** a **X** com inclusões intraplaquetárias. Coloração Giemsa. Objetiva 100X.



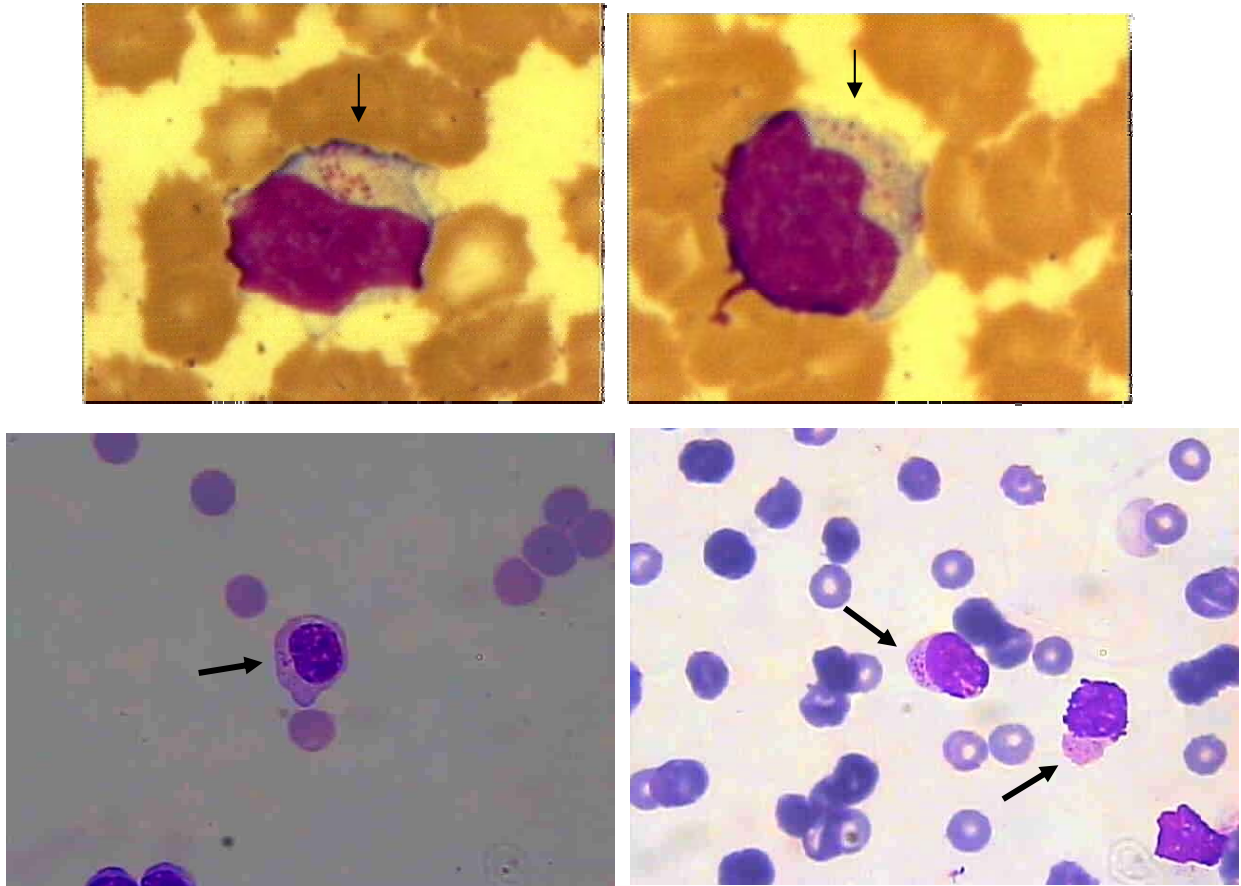


Figura 2. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para *E. canis*, demonstrando formas sugestivas de corpúsculos elementares erliquiais (seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100 X.

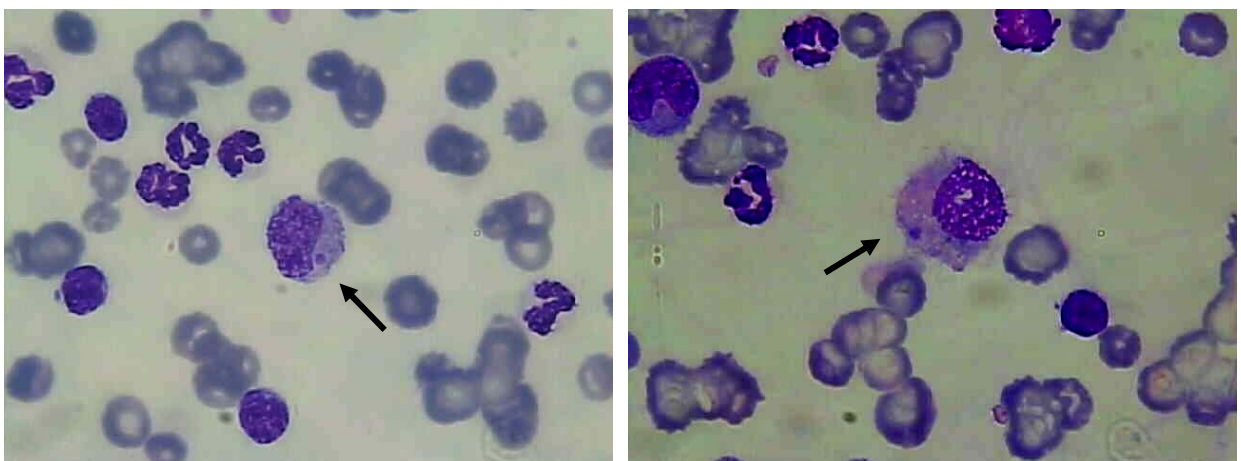


Figura 3. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para *E. canis*, demonstrando formas sugestivas de corpúsculos iniciais erliquiais (seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100X.



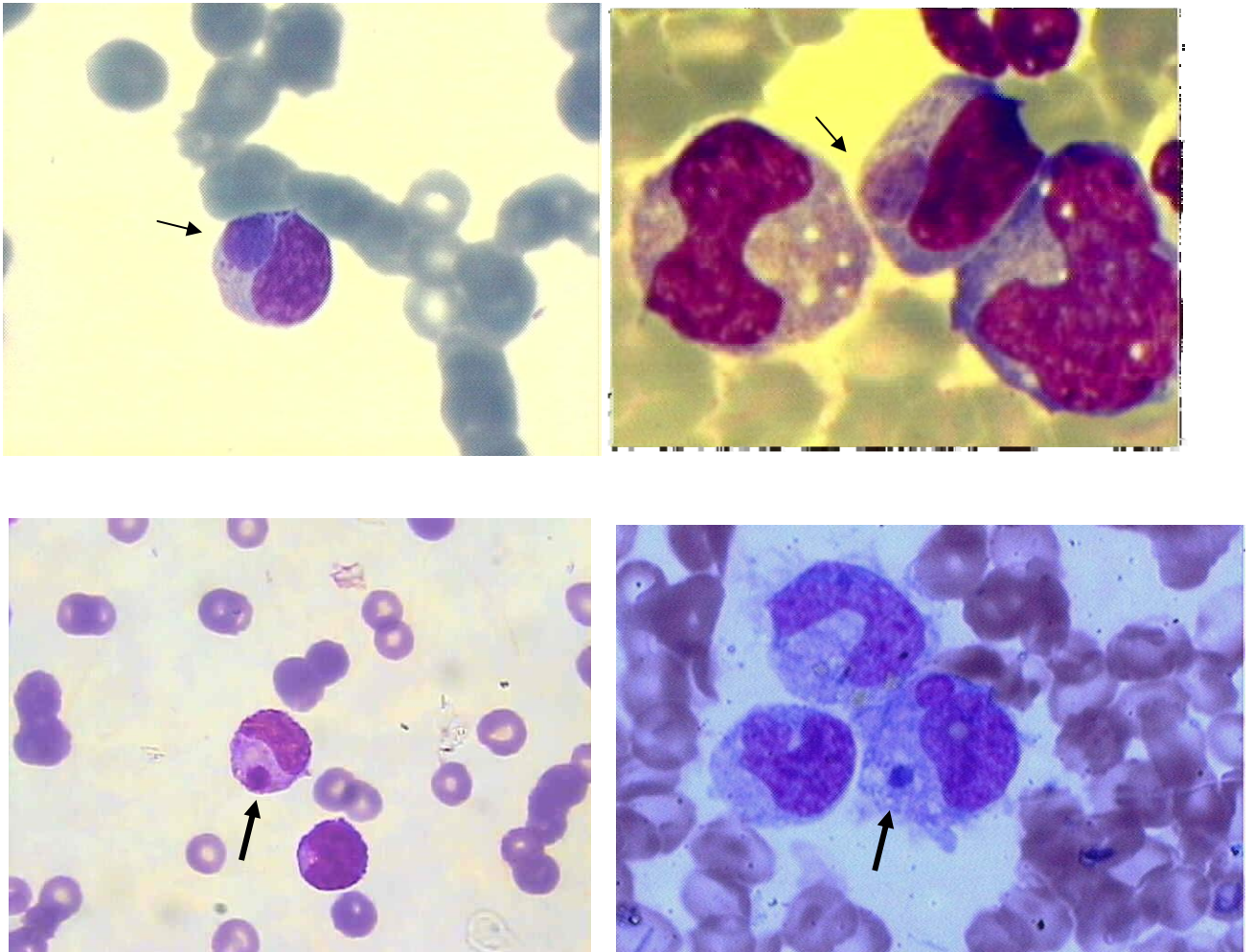


Figura 4. Fotomicrografias de esfregaços de papa leucocitária de sangue de cães positivos na nPCR para *E. canis*, demonstrando formas sugestivas de mórulas erliquiais (seta). Coloração Giemsa. Objetiva 100 X.

## 5.2 Detecção de DNA de agentes da Família Anaplasmataceae

DNA de agentes da Família Anaplasmataceae foram amplificados em 45/55 (81,8%) das amostras sanguíneas examinadas (Tabela 7, Figura 5). Pela nPCR de *E. canis*, foram positivas 22 amostras (40%) de Jaboticabal e 10 amostras (18,2%) de Campo Grande. DNA do agente *A. platys* foi amplificado em 2 (3,63%) amostras de Jaboticabal e em 11 (20%) amostras de Campo Grande (Figura 6). As 13 amostras positivas para *A. platys* foram também positivas na nPCR de agentes que compõem o genogrupo *A. phagocytophilum* (gene 16S rRNA) (Figura 7). Foi então realizada uma reação de PCR para o agente *A. phagocytophilum* com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene que codifica a proteína principal de membrana 2 (MSP-2), no entanto, nessa PCR, todas as amostras foram negativas. Dez amostras (18,2 %) foram negativas para todos os agentes testados. Todos os resultados estão sumarizados na Tabela 7.

Os animais de números 15 e 24 apresentaram inclusões citoplasmáticas em leucócitos mononucleares (monócitos) e em plaquetas, porém apresentaram PCR positiva apenas para *E. canis* (Tabela 7). O animal número 27 apresentou inclusões citoplasmáticas apenas em plaquetas e apresentou resultados positivos na PCR de *E. canis* e na primeira etapa da PCR para o gene 16S de *A. phagocytophilum* (*E. equi*). Ao contrário, o animal número 30 apresentou inclusões citoplasmáticas em monócitos e em plaquetas e teve amplificação de DNA positiva apenas para o agente *A. platys* e genogrupo de *A. phagocytophilum*, sendo negativo na reação da PCR para a espécie *E. canis*. O animal 14 apresentou inclusões apenas em monócitos e teve amplificação de DNA positiva para ambos os agentes erliquiais *E. canis* e *A. platys*. Os animais 46, 47 e 48, apesar de terem sido incluídos por apresentarem inclusões durante exame citológico de rotina, não apresentaram as inclusões citoplasmáticas nas papas leucocitárias realizadas posteriormente e também foram negativos para todas as reações da PCR realizadas. Também os animais 49, 50, 52, 53, 54 e 55, os quais foram incluídos neste estudo por terem apresentado previamente inclusões citoplasmáticas em plaquetas e o 51, em monócitos, apresentaram reações de PCR negativas para todos os agentes testados.

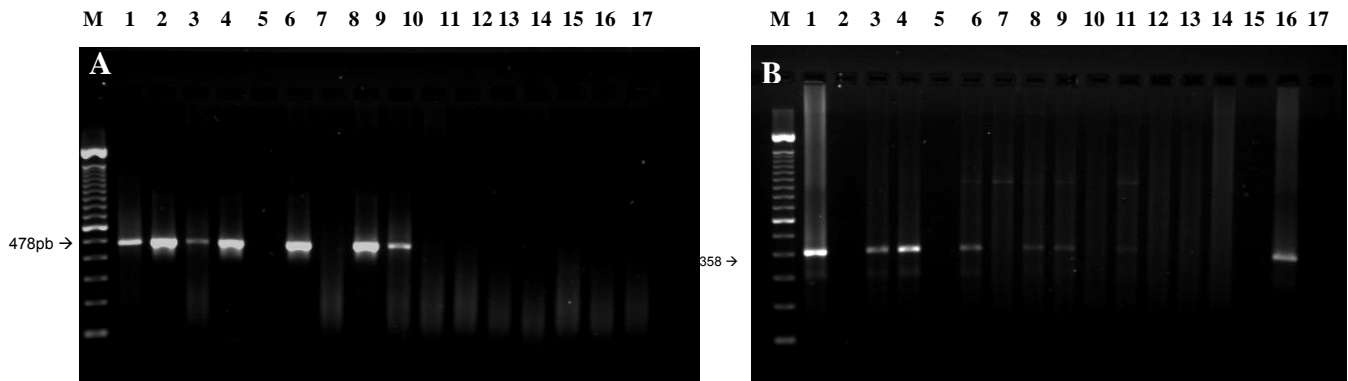


Figura 5. Fotografias de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto **A** são relativos a PCR para *Ehrlichia* spp obtidos com oligonucleotídeos iniciadores ECC/ECB e têm tamanho aproximado de 478 pares de bases. A foto **B** mostra amplímeros formados na reação de “nested” PCR para a espécie *E. canis*, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores CAN/GAIUR e têm tamanho aproximado de 358 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen<sup>®</sup>); canaleta 1: controle positivo (amostra *E. canis*-Jaboticabal); canaletas 2 a 16: amostras testadas e canaleta 17: controle negativo da reação.

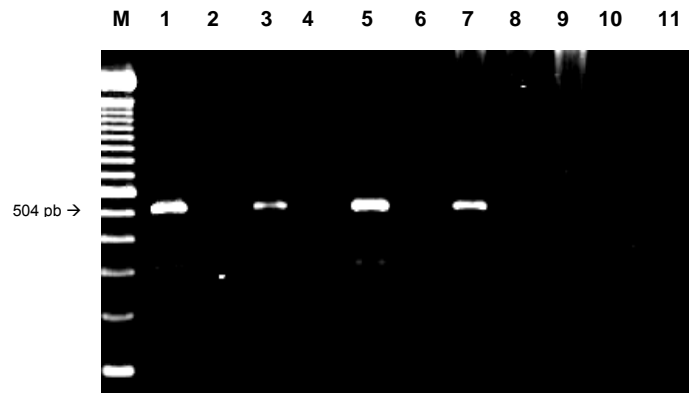


Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos a PCR para *Anaplasma platys* obtidos com oligonucleotídeos iniciadores Platys-F/Platys-R, e têm tamanho aproximado de 504 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen<sup>®</sup>); canaleta 1: controle positivo (amostra *A. platys*- Campo Grande); canaletas 2 a 10: amostras testadas; e canaleta 11: controle negativo da reação.

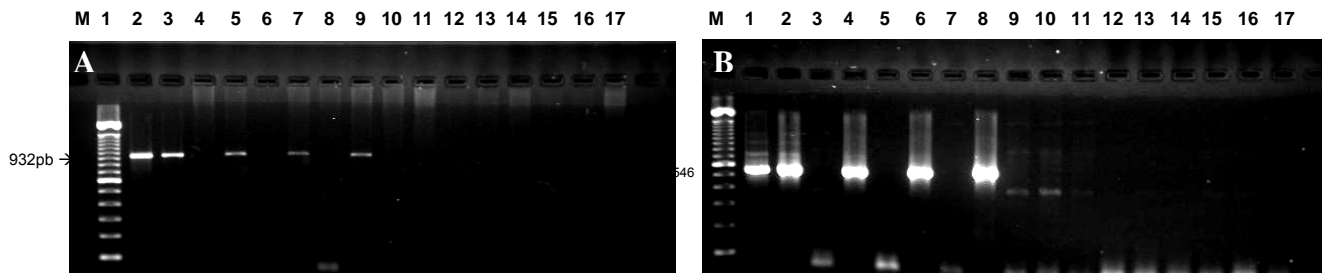


Figura 7. Fotografias de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto **A** são relativos a PCR para o gênero *Anaplasma*, obtidos com oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R e têm tamanho aproximado de 932 pares de bases. A foto **B** mostra amplímeros formados na reação de “nested” PCR para todos os membros do Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores gE9F/gE2R e têm tamanho aproximado de 546 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *Anaplasma phagocytophilum*-Mariland, Estados Unidos); canaletas 2 a 16: amostras testadas; e canaleta 17: controle negativo da reação.

### 5.3 Detecção de DNA de *Babesia canis*

Quatro amostras provenientes de Jaboticabal e uma de Campo Grande foram positivas na PCR para *Babesia canis* (Figura 8). Todos os cinco amplicómeros para esse agente apresentaram padrão de restrição compatíveis com *Babesia canis vogeli*.

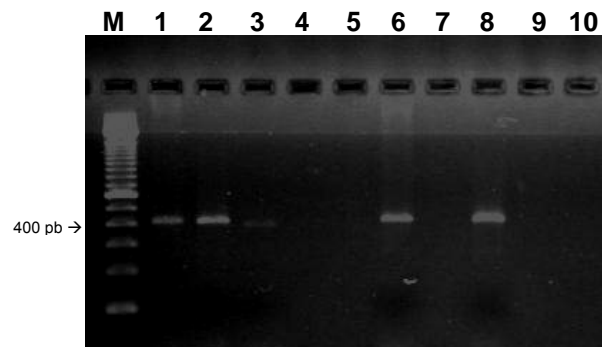


Figura 8. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos a PCR para *Babesia canis* obtidos com oligonucleotídeos iniciadores Piro-A/Piro-B, e têm tamanho aproximado de 400 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *Babesia canis*-São Paulo); canaletas 2 a 9: amostras testadas; e canaleta 10: controle negativo da reação.

#### 5.4 Seqüenciamento das amostras positivas para Família Anaplasmataceae com amplímero, produto dos oligonucleotídeos iniciadores 750R e EC3

Todas as amostras previamente positivas na reação de PCR para *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp foram novamente amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores 750R/EC3, e os amplímeros resultantes dessa reação foram purificados e seqüenciados (Figura 9).

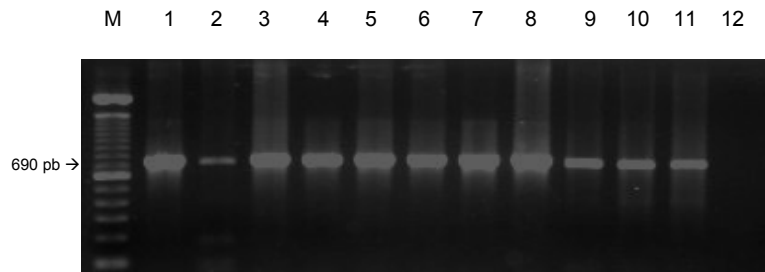


Figura 9. Fotografia de eletroforese em gel de Agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para *Ehrlichia* spp, obtidos com oligonucleotídeos iniciadores 750F/EC3, e têm tamanho aproximado de 690 pares de bases. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo (amostra *E. canis*-Jaboticabal); canaletas 2 a 11: amostras positivas; e canaleta 12: controle negativo da reação.

#### 5.5 Seqüenciamento das amostras positivas para o Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum* com amplímero, produto dos oligonucleotídeos iniciadores gE3a e gE10R

Todas as amostras previamente positivas para *Anaplasma platys* e para o Genogrupo *A. phagocytophilum* foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R para posterior seqüenciamento. O padrão de similaridade de

seqüências obtidas com as amostras positivas para *E. canis* e *Anaplasma* spp estão listados nas Tabelas 4, 5 e 6.

### 5.6 Análise de similaridade das seqüências obtidas pelo BLAST

Os amplicómeros (691pb) dos produtos dos oligonucleotídeos iniciadores do gene 16S rRNA (750F/EC3), seqüenciados das amostras positivas pela PCR anteriormente, revelaram altos graus de identidade com seqüências previamente publicadas no GenBank (Tabela 4). A amostra-padrão de *E. canis* de Jaboticabal apresentou um amplicómero com porcentagem de similaridade de 98,73% ( $e=0$ ) para o gene 16S rRNA com uma amostra publicada no GenBank de *E. canis* da Espanha (AY 394.465). As amostras seqüenciadas que apresentaram a menor porcentagem de identidade com amostra de *E. canis* da Espanha (número de acesso AY 394.465), foram as de números 8 (94,82%) e 15 (95,27%). A maior porcentagem de similaridade encontrada foi de 99,67% para a amostra de número 3, com o comprimento de alinhamento de 304. As amostras anteriormente positivas nas reações da PCR para *Anaplasma* spp e/ou *Anaplasma platys*, quando submetidas à reação da PCR com oligonucleotídeos iniciadores 750F/EC3, não produziram amplicómeros com seqüências similares com as amostras de *E. canis* previamente publicadas no GenBank (Tabela 4), sendo identificados na tabela como amostras de similaridade não-encontrada (NE). Entretanto, estes amplicómeros (produtos dos oligos 750F/EC3), quando comparados com seqüências publicadas de amostras positivas para *Anaplasma* spp e *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* apresentaram resultados indicativos de similaridade (Tabela 5). As amostras que apresentaram as maiores porcentagens de similaridade foram as de número 35 e 42 (99,69%) com uma amostra depositada no GenBank de *A. platys* da Venezuela (número de acesso AF 399.917). E a amostra que apresentou a menor porcentagem de similaridade encontrada foi a 36 (97,17%) em relação a uma seqüência de *A. phagocytophilum* dos Estados Unidos (número de acesso U 23.039).

As seqüências dos amplicómeros, produtos dos oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R, derivados do gene 16S rRNA para o Genogrupo *A. phagocytophilum*,

apresentaram uma qualidade baixa para análise. Para tentar melhorar esta má qualidade dos amplicómeros seqüenciados, foram realizadas várias reações de seqüenciamento, considerando-se quantidades maiores e menores de DNA em relação às aquelas inicialmente testadas buscando-se obter produtos de melhor qualidade. Destas, apenas quatro amostras produziram seqüências com qualidade para análise, fornecendo eletroferogramas com picos altos e limpos, linhas de base nítidas e homogêneas e número de “n”s baixo ou ausente. Apenas as amostras de números 33, 34, 35 e 42 forneceram seqüências para utilização em análises de homologia e filogenia. A porcentagem de similaridade e o comprimento de alinhamento com a seqüência de *A. platys*-Espanha (número de acesso AY 530.806) foi analisada com a amostra 35, revelando valores de 97,51% (804). Essa mesma amostra apresentou 95,50% (778) e 97,94% (777) de similaridade com a seqüência de *A. phagocytophilum* encontrada em cervos nos Estados Unidos (número de acesso U 23.039) e uma seqüência descrita em carrapato *Hyalomma truncatum* da Namíbia-África (número de acesso U 56.806), respectivamente.

Novas reações de PCR, seguidas de purificação de amplicómeros, produtos dos oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R, derivados do gene 16S rRNA para o Genogrupo *A. phagocytophilum* e seqüenciamento, foram então realizadas com as amostras positivas, e os resultados obtidos nas análises estão listados na Tabela 6. As maiores porcentagens de similaridade comparadas com as amostras de *A. platys* da Espanha e da Bélgica (números de acesso AY 530.806 e AY 821.826) foram encontradas com as amostras 41 (97,77%) e 42 (97,87%), e com a amostra 34 observou-se a menor porcentagem de similaridade (83,79%). Com uma amostra de *A. platys* da Venezuela (número de acesso AF 399.917), as amostras 36, 41 e 42 foram as que apresentaram as maiores porcentagens de similaridade, de 97,93%, 97,59% e 97,63%, respectivamente; e a menor porcentagem de similaridade foi encontrada com a amostra 34 (83,40%). Uma amostra, publicada no GenBank, de *Ehrlichia* spp encontrada em cervídeos nos Estados Unidos (número de acesso U 27.103), quando comparada com os amplicómeros de Genogrupo *A. phagocytophilum*, apresentou maior porcentagem de similaridade com a amostra 42 (97,03%); menor porcentagem de



similaridade com a amostra 39 (94,60%); e similaridade não encontrada com as amostras 14, 34 e 40. Também, com uma amostra publicada no GenBank de *Ehrlichia* spp (número de acesso U 54.806), a amostra 42 foi a que apresentou a maior porcentagem de similaridade (97,87%), e a menor porcentagem de similaridade foi encontrada com a amostra 34 (83,79%).

Tabela 4. Comparação da Homologia entre as seqüências dos amplicómeros obtidos na PCR com os oligos 750F/EC3 de fragmento do gene 16S rRNA para *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp (Família Anaplasmataceae) (691pb) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da Porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST (eValue=0).

Amostra nº	AF 318.946 <sup>a</sup>	ESU 54.805 <sup>b</sup>	AY 394.465 <sup>c</sup>	AF 414.399 <sup>d</sup>
1.	95,85% (554)	95,85% (554)	95,85% (554)	95,13% (554)
2.	96,33% (545)	96,33% (545)	96,33% (545)	96,53% (519)
3.	99,67% (304)	99,67% (304)	99,67% (304)	99,34% (304)
4.	99,22% (644)	99,22% (644)	99,06% (637)	98,45% (644)
5.	96,29% (404)	96,29% (404)	96,29% (404)	96,04 % (404)
6.	97,67% (557)	97,67% (557)	97,67% (557)	96,95% (557)
7.	98,40% (500)	98,40% (500)	98,40% (500)	97,80% (500)
8.	94,82% (502)	94,82% (502)	94,82% (502)	94,22% (502)
9.	NS	NS	NS	NS
10.	95,88% (631)	95,88% (631)	95,88% (631)	97,7% (565)
11.	96,68% (482)	96,68% (482)	96,68% (482)	97,12% (452)
12.	96,22% (555)	96,22% (555)	96,22% (555)	95,50% (555)
13.	99,33% (596)	99,33% (596)	99,31% (580)	98,66% (596)
14.	98,92% (462)	98,92% (462)	98,92% (462)	98,27% (462)

Continua...

## Continuação da Tabela 4.

15.	95,27% (571)	95,27% (571)	95,27% (571)	97,03% (505)
16.	98,64% (660)	98,64% (660)	98,45% (645)	97,88% (660)
17.	98,74% (633)	98,74% (633)	98,57% (631)	98,10% (633)
18.	99,38% (649)	99,38% (649)	99,23% (646)	98,77% (648)
19.	98,88% (623)	98,88% (623)	98,85% (607)	98,07% (623)
20.	NS	NS	NS	NS
21.	99,53% (694)	99,53% (694)	99,38% (694)	98,91% (694)
22.	NS	NS	NS	NS
23.	NS	NS	NS	NS
24.	99,69% (644)	99,69% (644)	99,53% (645)	99,07% (644)
25.	99,53% (645)	99,53% (645)	99,38% (643)	98,91% (645)
26.	98,77% (649)	98,77% (649)	98,61% (647)	98,15% (649)
27.	99,53% (645)	99,53% (645)	99,38% (643)	99,91% (645)
28.	NS	NS	NS	NS
29.	NS	NS	NS	NS
30.	NE	NE	NE	NE
31.	99,35% (620)	99,35% (620)	99,17% (605)	98,55% (620)

Continua...

Continuação da Tabela 4.

32.	NE	NE	NE	NE
33.	NE	NE	NE	NE
34.	NE	NE	NE	NE
35.	NE	NE	NE	NE
36.	NE	NE	NE	NE
37.	NE	NE	NE	NE
38.	NE	NE	NE	NE
39.	NE	NE	NE	NE
40.	NE	NE	NE	NE
41.	99,08% (653)	99,08% (653)	99,06% (637)	98,32% (653)
42.	98,99% (595)	98,95% (595)	98,97% (580)	98,32% (595)
43.	95,56% (540)	95,56% (540)	95,56% (540)	95,00% (540)
<i>Eca- Jab.*</i>	98,76% (647)	98,76% (647)	98,73% (631)	97,99% (647)

<sup>a</sup>16S rRNA de *Ehrlichia ovina* (BEKKER et al., 2002); <sup>b</sup>16S rRNA de *Ehrlichia* spp (ALLSOPP et al., 1997); <sup>c</sup>16S rRNA de *Ehrlichia canis* - Spain (AGUIRRE et al., 2004) ; <sup>d</sup>16S rRNA de *Ehrlichia* spp -Tibet (WEN et al., 2002). \**E. canis* -amostra padrão isolada em Jaboticabal- SP (MACHADO, 1993 apud CASTRO et al., 2004). NS - Não seqüenciada ; NE- Não encontrado.

Tabela 5. Comparação da Homologia entre as seqüências dos amplicómeros obtidos na PCR com os oligos 750F/EC3 de fragmento do gene 16S rRNA para *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp (Família Anaplasmataceae) (691pb) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da Porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST com as amostras integrais sem alinhamento prévio (eValue=0).

Amostra n°	U23.039 <sup>a</sup>	U 27.103 <sup>b</sup>	AY 530.806 <sup>c</sup>	AF 399.917 <sup>d</sup>
30. (AP01)	98,09% (472)	98,45% (387)	96,52% (604)	96,52% (604)
14. (AP02)	NE	NE	NE	NE
32. (AP03)	98,59% (497)	99,25% (402)	99,22% (642)	99,53% (641)
33. (AP04)	98,19% (497)	99,74% (390)	98,91% (642)	99,22% (641)
34. (AP05)	98,39% (497)	99,00% (402)	99,06% (640)	99,37% (639)
35. (AP06)	98,79% (497)	99,50% (402)	99,37% (638)	99,69% (637)
36. (AP07)	97,17% (389)	98,56% (347)	97,94% (389)	97,94% (389)
37. (AP08)	NE	NE	98,92% (648)	99,23% (647)
38. (AP09)	98,39% (497)	99,00% (402)	99,06% (640)	99,37% (639)
39. (AP10)	98,39% (497)	99,74% (390)	99,07% (642)	99,38% (641)
40. (AP11)	97,79% (497)	99,49% (389)	98,59% (640)	98,90% (639)
41. (AP12)	98,19% (497)	99,74% (390)	98,92% (646)	99,22% (645)
42. (AP13)	98,79% (497)	99,50% (402)	99,38% (640)	99,69% (639)

<sup>a</sup>16S rRNA de *Ehrlichia* spp (ANDERSON et al., 1996); <sup>b</sup>16S rRNA de *Ehrlichia* spp (DAWSON et al., 1996); <sup>c</sup>16S rRNA de *Anaplasma platys* - Spain (SAINZ et al., 2004) ; <sup>d</sup>16S rRNA de *Anaplasma platys*-Venezuela (HUANG et al., 2005). NS - Não seqüenciada ; NE - Não encontrado.

Tabela 6. Comparação da Homologia entre as seqüências dos amplicómeros obtidos em PCR com os oligos gE3a/Ge10R de fragmento do gene 16S rRNA do Genogrupo *A. phagocytophilum* (Família Anaplasmataceae) (930pb) com amostras publicadas no GenBank, com o valor da Porcentagem de identidade e o comprimento do alinhamento, utilizando-se o BLAST com as amostras integrais sem alinhamento prévio (eValue=0).

Amostra nº	AY 530.806 <sup>a</sup>	AY 821.826 <sup>b</sup>	AF399.917 <sup>c</sup>	U 27.103 <sup>d</sup>	U 54.806 <sup>e</sup>
30. (AP01)	97,72 (571)	97,55 (572)	97,55 (571)	96,15 (571)	97,72 (571)
14. (AP02)	94,63 (391)	94,63 (391)	94,37 (391)	NE	94,63 (391)
32. (AP03)	96,28 (618)	96,12 (619)	96,12 (618)	94,98 (618)	94,34 (618)
33. (AP04)	97,36% (530)	97,36% (530)	97,17% (530)	95,66% (530)	95,28% (530)
34. (AP05)	83,79% (253)	83,79% (253)	83,40% (253)	NE	83,79% (253)
35. (AP06)	96,32% (544)	96,32% (544)	96,14% (544)	94,67% (544)	96,32% (544)
36. (AP07)	97,10% (586)	97,10% (586)	97,93% (586)	95,56% (586)	97,10% (586)
37. (AP08)	96,52% (690)	NE	96,38% (690)	95,73% (655)	96,52% (690)
38. (AP09)	NS	NS	NS	NS	NS
39. (AP10)	96,20% (500)	96,20% (500)	96,00% (500)	94,60% (500)	96,20% (500)
40. (AP11)	95,72% (584)	95,72% (584)	95,55% (584)	NS	95,72% (584)
41. (AP12)	97,77% (539)	97,77% (539)	97,59% (539)	96,10% (539)	97,77% (539)
42. (AP13)	97,87% (422)	97,87% (422)	97,63% (422)	97,03% (404)	97,87% (422)

<sup>a</sup>16S rRNA de *Anaplasma platys* - Spain (SAINZ et al., 2004); <sup>b</sup>*Anaplasma platys* – Bélgica (DUH et al., 2004, Unpublished); <sup>c</sup>16S rRNA de *Anaplasma platys* -Venezuela (HUANG et al., 2005); <sup>d</sup>16S rRNA de *Ehrlichia* spp-cervos (DAWSON et al., 1996); <sup>e</sup>16S rRNA de *Ehrlichia* spp (ALLSOPP et al., 1997).

NS - Não seqüenciada; NE - Não encontrado.

### 5.7 Demonstração de Dendogramas Filogenéticos das seqüências obtidas dos amplicómeros com alinhamento múltiplo pelo CLUSTAL-W e Mega-2

A matriz de distância e o método de construção do Dendograma Filogenético foram calculados com Kimura-2 parâmetros, “Neighbor-Joining” com “bootstrap” pelo programa Mega-2. As amostras foram numeradas em ordem crescente, seguindo a mesma ordem de entrada no estudo, e as seqüências de comparação do GenBank foram identificadas pelo seu número de acesso. Observou-se aqui a importância do alinhamento múltiplo prévio feito pelo programa Clustal-W, pois, ao formar a figura de dendograma filogenético sem esse alinhamento prévio, formaram-se vários pequenos ramos com pequenos “clusters” de amostras, geralmente de duas, dificultando a visualização de similaridade entre as seqüências externas do GenBank e as seqüências deste estudo. Assim, tornou-se fundamental a realização de um alinhamento múltiplo de seqüências pelo programa Clustal-W, para uma posterior formação da árvore filogenética pelo programa Mega-2. E, nesse processo, a série de formações com todas as possibilidades de dendogramas, denominada de “bootstrap”, tornou-se necessária em uma alta repetição, realizando-se assim o “bootstrapp” de 1.000.

Quando formada a filogenia apenas com as seqüências derivadas das amostras amplificadas com os oligos 750F/EC3 e das seqüências com maiores porcentagens de identidade encontradas pelo Blast (Figura 10), o dendograma filogenético formado demonstra que a maioria das amostras positivas para *E. canis* agruparam-se em um grande grupo (“Cluster”) juntamente com a amostra-padrão de *E. canis* de Jaboticabal (controle positivo) e dos Estados Unidos (controle positivo) e seqüências externas obtidas pelo BLAST-n (números de acesso AF 318.946, AY 394.465, AF 373.615 e U 54.805), referentes ao Gênero *Ehrlichia*. A formação de uma outra clade foi observada com as amostras positivas para *A. platys* juntamente com seqüências externas do BLAST (números de acesso U54.806, AF399.917, AY 530.806 e U 27.103), referentes ao gênero *Anaplasma*. Também se observou que, entre as seqüências estudadas, uma similaridade entre elas superior a 95% pôde ser visualizada pelo dendograma.

O dendograma filogenético, formado apenas com as seqüências derivadas dos produtos obtidos com os oligos gE3a/gE10R (Figura 11), demonstra que quase todas as

seqüências de *A. platys* formaram um grupo único, incluindo as seqüências externas de *A. platys*, do Blast, de um cão da Bélgica, porém oriundo da Espanha (número de acesso AY 821.826), *A. platys* da Espanha (número de acesso AY 530.806) e de *Ehrlichia* spp (números de acesso U 54.806 e U 27.103). A seqüência externa de *A. platys* da Venezuela (número de acesso AF 399.917) ficou fora desse grupo principal, porém com uma similaridade superior a 95% com o mesmo. As seqüências desse estudo AP 06 e AP13 alinharam-se um pouco mais distante da clade principal, porém com uma distância muito pequena e também próximas da seqüência de *A. platys* da Venezuela. Saíram da clade principal as seqüências AP 05 e Ap 09, indicando que essas duas amostras apresentam uma similaridade menor com as seqüências do grupo principal, porém com a AP 05 sendo mais similar as seqüências do Grupo de estudo do que a AP 09.

Também foi realizada análise filogenética para formação do dendograma das amostras positivas para *Babesia canis*, e o dendograma gerado está demonstrado na Figura 12. As seqüências de *B. canis* obtidas neste estudo, previamente identificadas como *B. canis vogeli* pela digestão com endonucleases de restrição, agruparam-se em um único “cluster” no dendograma, sendo incluídas nessa clade as seqüências externas do BLAST de *B. canis vogeli* (números de acesso AY 150.061, AJ 009.796 e AY 102.162) e *Babesia* spp do Japão (número de acesso AY 077.719). A seqüência externa do BLAST referente à *B. canis canis* (número de acesso DQ 174.289) foi a que teve uma maior proximidade na árvore filogenética com as seqüências deste estudo, apesar de estar agrupada fora do “cluster” pertencente a *Babesia canis vogeli*. Também as seqüências externas do BLAST de *Babesia canis rossi* (número de acesso DQ 111.764) e de *Babesia canis canis* (número de acesso AY 150.060) ficaram em uma outra clade externa e distante da clade principal das seqüências desse estudo, com uma similaridade inferior a 25%.

Foi realizada uma formação de dendograma com duas amostras representativas de Jaboticabal para *E. canis* e *A. platys* (nºs de acesso no GenBank DQ 40.144 e DQ 40.145, respectivamente) e algumas amostras disponíveis no GenBank (Figura 13).





Figura 10. Dendrograma Filogenético exibindo as amostras positivas para a Família Anaplasmataceae: gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 1.000 repetições. As seqüências nativas foram enumeradas de acordo com o critério de entrada no estudo (ordem crescente), e as seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank.

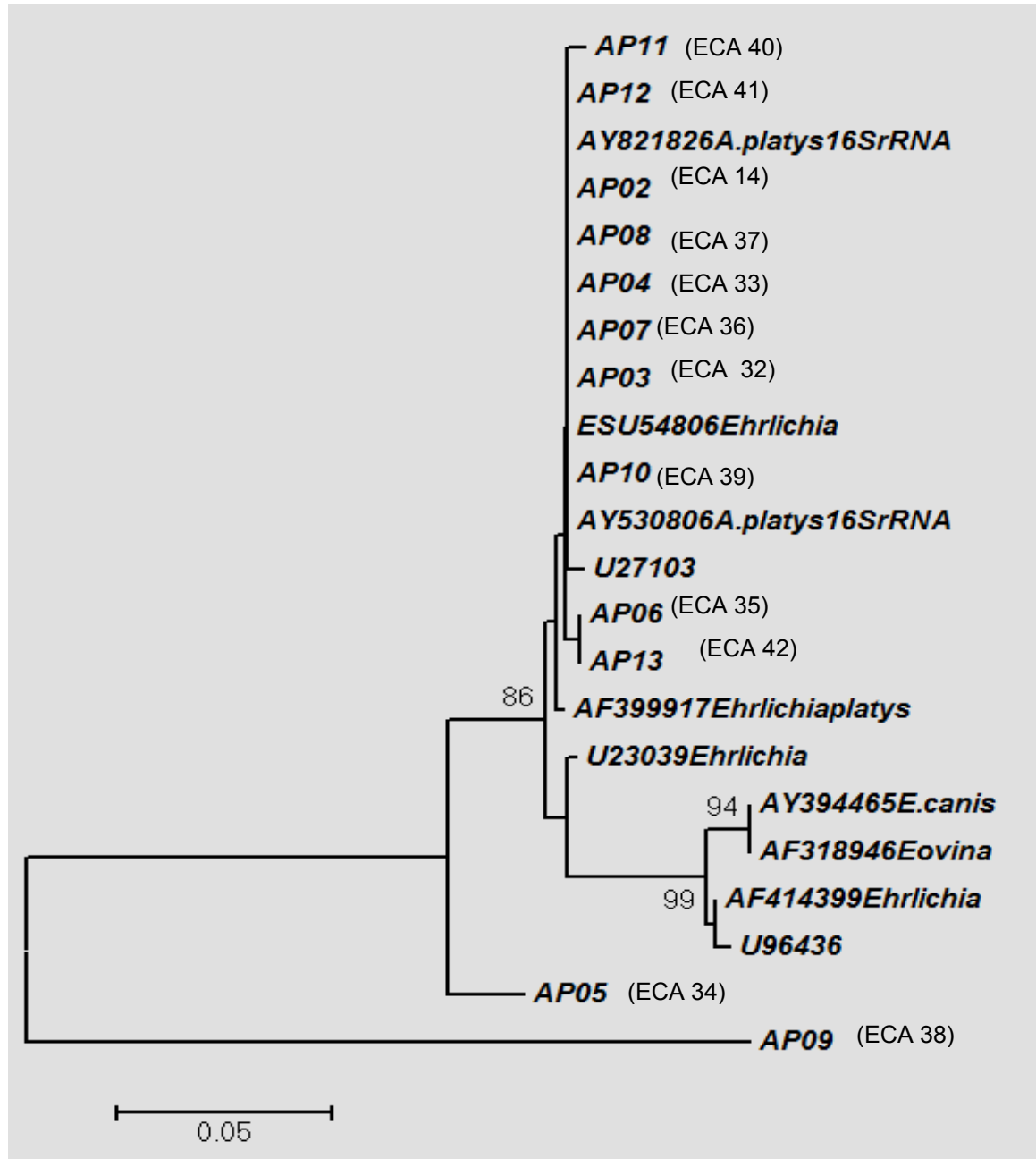


Figura 11. Dendrograma Filogenético exibindo as amostras positivas para o Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*, obtidas com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 1.000 repetições. As seqüências nativas foram enumeradas de acordo com o critério de entrada no estudo (ordem crescente), e as seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank.

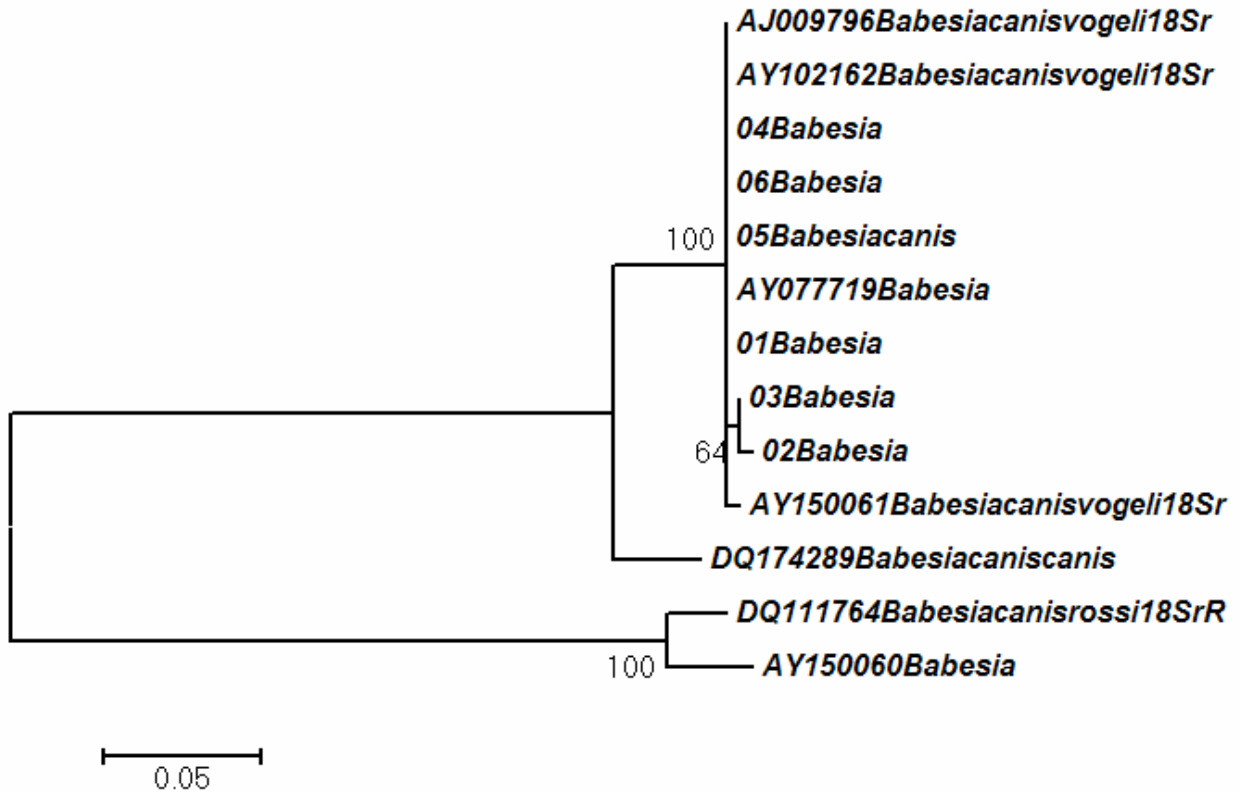


Figura 12. Dendograma Filogenético exibindo as amostras positivas para *Babesia canis*, obtidas com seqüências parciais do gene 18S rRNA (5'- 3') de amostras de sangue de cães naturalmente infectados. O método de construção foi calculado pelo algoritmo "Neighbor-Joining" com "Bootstrap" de 1.000 repetições. As seqüências nativas foram enumeradas de acordo com o critério de entrada no estudo (ordem crescente), e as seqüências utilizadas nas comparações estão indicadas pelo número de acesso do GenBank.

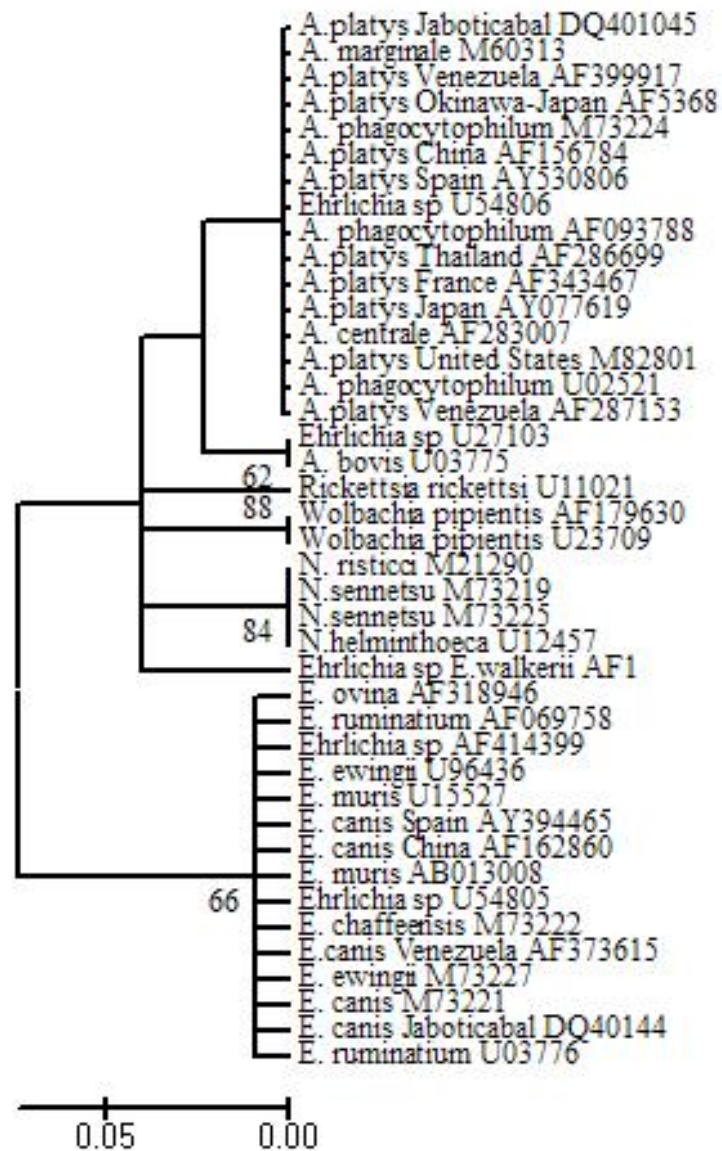


Figura 13. Dendrograma Filogenético com seqüências parciais do gene 16S rRNA exibindo comparação de duas amostras representativas de Jaboticabal-SP, pertencentes à Família Anaplasmataceae: *Ehrlichia canis* (número de acesso do GenBank DQ 40.144) e *Anaplasma platys* (número de acesso do GenBank DQ 40.145) obtidas de sangue de cães naturalmente infectados com amostras disponíveis no GenBank. Alinhamento múltiplo com o Clustal-W, método de construção calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com método de distância Kimura-2 parâmetros e com “Bootstrap” de 1.000 repetições. As seqüências disponíveis no GenBank utilizadas nas comparações estão indicadas pelo gênero e espécie seguidos pelo número de acesso do GenBank.

### 5.8 Perfil de digestão dos amplicómeros, produtos da PCR com endonucleases de restrição para o Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*

As treze amostras positivas na PCR para *Anaplasma platys* e positivas na nPCR para o Genogrupo *A. phagocytophilum*, como demonstradas anteriormente na Figura 7, foram submetidas à reação de digestão com endonucleases de restrição *Ava* I e *Eco* NI, o que confirmou a especificidade da PCR, revelando que essas amostras eram de fato amplicómeros de *A. platys* (Figura 14).

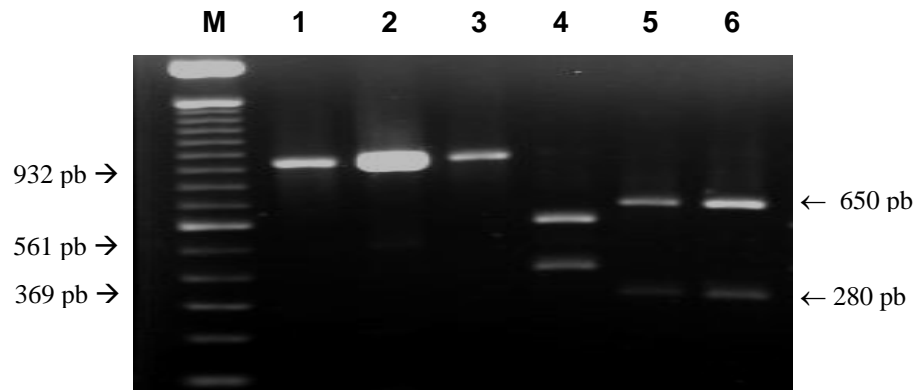


Figura 14. Fotografia de eletroforese de gel de Agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para o Genogrupo *Anaplasma phagocytophilum*, obtidos com oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R, e têm tamanho aproximado de 932 pares de bases, e digestão com endonucleases de restrição *Ava* I and *Eco* NI. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); canaleta 1: controle positivo puro de *A. phagocytophilum* (amostra Estados Unidos); canaleta 2: controle positivo puro de *Anaplasma platys* (amostra Campo Grande); canaleta 3: controle positivo de *Anaplasma phagocytophilum* não clivado com *Ava* I; canaleta 4: controle positivo de *Anaplasma platys* clivado com *Ava* I em fragmentos de 561 pb e de ~369 pb; canaletas 5 e 6: controle positivo de *Anaplasma phagocytophilum* e controle positivo de *Anaplasma platys* clivados com *Eco* NI em fragmentos de 280 pb e de ~650 pb.

Tabela 7. Resultados obtidos pela PCR e “nested” PCR para detecção de agentes da Família Anaplasmataceae, realizados em 55 amostras de sangue de cães naturalmente infectados, oriundos da cidade de Jaboticabal – SP e de Campo Grande – MS, no ano de 2004.

AMOSTRA Nº	Inclusão Intracelular <sup>a</sup> (Papa leucocitária)	<i>E. canis</i>		<i>E. chaffeensis</i>		<i>A. phagocytophilum</i> <sup>b</sup>		<i>A. platys</i>	<i>E. ewingii</i>			<i>A. phagocytophilum</i> 16S rRNA		<i>A. phagocytophilum</i> <sup>c</sup> Msp-2		<i>N. risticii</i>		<i>B. canis</i>
		PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	PCR	nPCR	PCR	PCR	nPCR
		Genogrupo																
1	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
2	Mon.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
3	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
4	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
5	Mon.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
6	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
7	Mon.	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
8	Mon.	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
9	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
10	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
11	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
12	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
13	Mon./Linf.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
14	Mon.	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
15	Mon./Plaq.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
16	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
17	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
18	Mon.	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
19	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
20	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
21	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
22	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
23	Plaq.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
24	Mon./Plaq.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
25	Plaq.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

Continua..

Continuação Tabela 7

26	Mon.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
27	Plaq.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
28	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
30	Mon./Plaq.	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
31	Mon.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
32	Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
33	Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
34	Mon./Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
35	Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
36	Plaq.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
37	Plaq.	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
38	Plaq.	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
39	Plaq.	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
40	Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
41	Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
42	Plaq.	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
43	Mon.	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
44	Mon.	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
45	Mon.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Plaq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	Plaq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Mon.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	Plaq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	Plaq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	Plaq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	Plaq.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Tipo celular onde foram encontradas inclusões sugestivas de infecção por agentes da Família Anaplasmataceae: Mon.- monócito; Linf. – linfócito; Plaq. – plaqueta; ( - ) - não observada inclusão. <sup>b</sup>PCR para o Genogrupo-*A. phagocytophilum* (gene 16S rRNA). <sup>c</sup>PCR para *A. phagocytophilum* (gene msp-2).

## 6. DISCUSSÃO

Os cães podem ser naturalmente infectados por vários agentes pertencentes à Família Anaplasmataceae, incluindo: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *N. helminthoeca*, *A. platys* e *E. ewingii* (DUMLER et al., 2001; INOKUMA et al., 2001; HEADLEY et al., 2006). Também co-infecções com outros agentes foram descritas em cães (BREITSCHWERDT et al., 1998; KORDICK et al., 1999), embora manifestações da doença causada pela *E. chaffeensis* e *E. ewingii* podem ser difíceis de distinguir daquelas causadas pela *E. canis* (BREITSCHWERDT et al., 1998). Tais descrições demonstram a importância de um diagnóstico etiológico definitivo, devido ao potencial zoonótico dos agentes e da possibilidade de infestação humana por carrapatos ectoparasitas geralmente de animais (PEREZ et al., 1996; WALKER e DUMLER, 1996; LABRUNA, 2004; TAMÍ e TAMÍ-MAURY, 2004; de la FUENTE et al., 2005; WALKER, 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006).

No presente trabalho, a identificação de inclusões citoplasmáticas em esfregaços de papa leucocitária corados pelo Giemsa, auxiliou no diagnóstico de infecções agudas dos cães, causadas por agentes da Família Anaplasmataceae. Entretanto, vale ressaltar a diversidade encontrada na morfologia, tamanho, coloração e localização das inclusões citoplasmáticas, as quais podem apresentar similaridade com inclusões decorrentes de infecções bacterianas severas (Corpúsculos de Döhle), inflamações, neoplasias, doenças auto-imunes, infecção viral (cinomose) e destruição tissular severa (JAIN, 1993; COWEL et al., 1999; SCHALM, 2000). Em cadelas, a presença da cromatina sexual em citoplasma de leucócitos (Corpúsculos de Barr) também deve ser diferenciada de inclusões (JAIN, 1993; SCHALM, 2000). As mórulas detectadas nos casos de erliquiose granulocítica canina (*E. ewingii*) ou anaplasmose granulocítica canina (*A. phagocytophilum*) não são morfologicamente diferenciadas pela microscopia óptica (PREOZI e COHN, 2002).

A presença de inclusões citoplasmáticas ou mórulas em esfregaços sangüíneos dos cães foi o critério para que cada animal constituísse o grupo experimental, demandando um longo tempo, razão pela qual acredita-se que a maioria dos animais



com sintomatologia clínica de doenças erliquiais encontravam-se em fase crônica, pois as inclusões citoplasmáticas são mais facilmente observadas na fase aguda da doença.

Em Infecção experimental com *E. canis* em cães, as inclusões citoplasmáticas foram observadas a partir do 10º dia até o 19º dia após inoculação (NYINDO et al., 1980; CASTRO et al., 2004). No entanto, mórulas foram identificadas a partir do 5º dia pós- infecção experimental com *A. phagocytophilum* em cães (EWING et al., 1997).

Em Londrina-PR, DAGNONE et al. (2003) detectaram DNA de *E. canis* em 21,7% (28/129) das amostras sangüíneas de cães selecionados pelos critérios de inclusão: anemia e/ou trombocitopenia e/ou infestação por carrapatos. A soroprevalência para o agente estudado nessa população foi de 23%. Um incremento de 4% na sensibilidade da leitura dos resultados obtidos pela técnica de PCR foi observado quando foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida corado com Nitrato de Prata na avaliação dos amplicómeros gerados na PCR (DAGNONE, 2002). Nesse estudo, ainda foi observado que a PCR foi mais sensível que a detecção direta de inclusões por microscopia óptica em papa de leucócitos corado pelo Giemsa.

No trabalho de NAKAGHI et al. (2004), trinta cães foram selecionados desde que apresentassem sinais clínicos compatíveis com a erliquiose canina. A detecção direta de mórulas em esfregaços de sangue de ponta de orelha foi positiva em apenas um animal (3,33%). Outrossim, 16 amostras de sangue foram positivas pela “nested” PCR (53,33%).

FARIA (2006) observou que a presença de mórulas em esfregaços de aspirado de baço (48,57%) foi mais significativa estatisticamente do que na papa de leucocitária do sangue (5,7%), em uma amostra de 40 cães com sintomatologia de erliquiose. Interessantemente, também foi observado que a nPCR de amostras de aspirado de baço foi mais sensível (81,8%) do que as de sangue (78,8%) na detecção de *E. canis*.

Em todos os estudos acima descritos, a PCR demonstrou ser mais sensível que a detecção direta da *E. canis* em esfregaços de papa leucocitária ou de ponta de orelha corados, embora na punção aspirativa do baço de animais suspeitos da doença a detecção direta de mórula possa ter alcançado 50% de sensibilidade. Tecidos, como baço, fígado, rins, mesentério, linfonodos poplíteos (IQBAL e RIKIHISA, 1994a), sangue

e material de medula óssea de cães infectados por *E. canis*, foram utilizados para a amplificação de DNA do parasita, porém foi verificado que o DNA extraído do baço é a amostra ideal para a PCR, diagnosticando o estado de portador deste agente durante a fase subclínica da doença (HARRUS et al., 1998; HARRUS et al., 2004).

Dessa forma, um diagnóstico diferencial criterioso para as diversas inclusões citoplasmáticas encontradas requer treinamento e atenção do técnico (EGENVAL et al., 1996; MENESES, 1997; HEEB et al., 2003). A associação com outros meios diagnósticos sorológicos ou moleculares confirma a suspeita clínica e aumenta a confiabilidade do resultado (BAKKEN et al., 1996).

Ainda assim, resultados negativos na detecção direta de inclusões citoplasmáticas não descartam as doenças erliquiais, pois as baixas e curtas parasitemias (DUPLESSIS et al., 1990; WOODY & HOSKINS, 1991; BOJERSSON et al., 2000), associadas à pancitopenia dificultam o encontro das inclusões, mesmo em animais com sintomas sugestivos da doença, podendo apresentar resultados negativos também por métodos moleculares (ALSOPP e ALSOPP, 2001).

Em estágios crônicos, a erliquiose monocítica canina também pode apresentar proliferações policlonais de linfócitos, que apresentam grânulos azurófilos proeminentes, de tamanho variando entre 0,5 a 1,0µm de diâmetro. Tais achados também devem ser utilizados para diferenciar essa doença de outras desordens linfocíticas proliferativas de origem neoplásica, como também de outros hemoparasitos e inclusões desconhecidas nas células (HEEB et al., 2003). Apesar de grânulos azurófilos serem um achado em casos de erliquiose crônica, tais grânulos, no entanto, devem ser diferenciados de corpúsculos de inclusão iniciais e elementares, que são a forma inicial do agente erliquial dentro do citoplasma da célula-hospedeira, indicativos da presença do agente infectante no sangue durante a fase aguda da doença.

As formas morulares de organismos pertencentes à Família Anaplasmataceae apresentam diferenças ultra-estruturais (POPOV et al., 1998). Todos os organismos formam células individuais similares, as quais, em cultura, apresentam duas formas morfológicas denominadas de células reticuladas e densamente coradas, ambas podendo se dividir por fissão binária. Entretanto, diferenças na estrutura das

microcolônias (mórulas) dos agentes permitiram a diferenciação dos genogrupos. As erlíquias, pertencentes ao genogrupo-*E. canis* (*E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. muris*), formaram mórulas grandes com muitas erlíquias suspensas freqüentemente em material fibrilar, agregadas, geralmente, em contato próximo com as mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira. Ao contrário, membros do genogrupo-*A. phagocytophilum* apresentaram mórulas menores sem matriz fibrilar e sem contato com as organelas da célula hospedeira. E os membros do genogrupo-*Neorickettsia* (*N. risticii* e *N. sennetsu*) geralmente se desenvolviam em pequenos vacúolos individuais que não se fusionavam uns com os outros (POPOV et al., 1998).

A amplificação de DNA de agentes da Família Anaplasmataceae deste estudo mostrou que 81,8% (45/55) das amostras sanguíneas examinadas foram positivas. Destas, 58,18% e 25,45% foram positivas para *Ehrlichia* sp e *Anaplasma* sp, respectivamente. Dez animais com os resultados negativos ao segundo exame microscópico também foram negativos na PCR para *E. canis*, *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. ewingii* e *N. risticii*, demonstrando a importância da utilização da associação entre as técnicas da PCR e o exame microscópico de esfregaço sanguíneo, para o estabelecimento de um diagnóstico confiável e definitivo.

Alguns protocolos, inicialmente descritos como específicos para amplificação para o diagnóstico de *A. platys*, também amplificam DNA de *A. phagocytophilum* (HANCOCK et al., 2001) e *Anaplasma marginale*. As 13 amostras positivas simultaneamente na PCR para o genogrupo-*A. phagocytophilum* e para o agente *Anaplasma platys*, foram submetidas a PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o agente *A. phagocytophilum* e reações com enzimas de restrição, e todas foram negativas.

O interessante é que, em 3 amostras diagnosticadas pela presença de inclusões em plaquetas, 2 foram positivas apenas para *E. canis* na nPCR e apenas 1 amostra foi positiva para a PCR de *A. platys*. Vale ainda ressaltar que foi possível diagnosticar um cão que apresentou co-infecção pelos agentes *E. canis* e *A. platys* pela reação de PCR, mas não se detectou inclusão citoplasmática em plaquetas. Esses resultados podem ser devidos à baixa parasitemia de *A. platys* associada ou não ao baixo número de

plaquetas. Dessa forma, uma caracterização gênica parcial do gene 16S rRNA de *A. platys* encontrada em cães naturalmente infectados de Jaboticabal-SP e Campo Grande-MS (DAGNONE et al., 2004; SOUZA et al., 2004) pôde ser confirmada, e a seqüência depositada no GenBank com o número de acesso DQ 40.145.

Em 2006, AGUIRRE et al. descreveram a primeira caracterização genética de *A. platys* (AY 530.806) em um cão naturalmente infectado na Espanha. Porém, várias descrições anteriores foram publicadas apenas nas páginas do GenBank sem estarem associadas a publicações em periódicos, dificultando a análise e comparação das metodologias utilizadas. Entretanto, inclusões no citoplasma de plaquetas de 12/87 (13,8%) foram descritas em seres humanos portadores do vírus da Imunodeficiência humana (HIV), na Venezuela (TAMÍ e TAMI-MAURY, 2004), porém esse diagnóstico citológico da presença do agente *A. platys* não foi confirmado por outros métodos de diagnósticos sorológicos ou moleculares.

Co-infecção com *E. canis* e *B. canis* e entre *A. platys* e *B. canis* foi encontrada em três e duas amostras, respectivamente. As amostras positivas para *Babesia canis* apresentaram padrão de corte esperado para *vogeli*, sendo esse mesmo padrão encontrado em outra amostra previamente descrita no Brasil (PASSOS et al., 2004).

Com o advento do aumento de testes sorológicos e moleculares, co-infecção com múltiplos organismos transmitidos por carrapatos tem sido descrita com maior frequência em cães e seres humanos nos Estados Unidos (MAGNARELLI et al., 1995; BREISTCHWERDT et al., 1998; KORDICK et al., 1999; SUKASAWAT et al., 2001). Porém, dados relacionados com co-infecções com múltiplos patógenos transmitidos por carrapatos são menos disponíveis em outros países. Na erliquiose monocítica canina, causada pela *E. canis*, o diagnóstico é rotineiramente baseado na sorologia (Imunofluorescência indireta, ELISA e Western immunoblotting) (WANER et al., 2001), uma vez que achados clínicos e clinicopatológicos são amplamente inespecíficos (COUTO, 1998).

Além desse auxílio na diferenciação de agentes co-infectantes, casos refratários à terapia (IQBAL e RIKIHISA, 1994b; HIGGINS et al., 1995; HUA et al., 2000) e de

reinfeção também são diagnosticados com melhor definição, utilizando-se a PCR (BREISTCHWERDT et al., 1997)

Em um outro estudo utilizando-se a PCR, entre 65 cães com carrapatos em Oklahoma, dez foram positivos para *Ehrlichia* spp, 4 para *E. ewingii* e *E. chaffeensis*, e 2 para *E. canis* (MURPHY et al., 1998). Ainda, co-infecção com três espécies erliquiais (*E. canis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*) sem nenhum sinal clínico típico de erliquiose foi relatada em um cão na Tailândia apresentando mórulas em monócitos e plaquetas, e outro na Venezuela, apresentando mórulas em monócitos, plaquetas e granulócitos (SUKASAWAT et al., 2001).

A análise filogenética com o uso do gene 16S rRNA (RELMAN, 1993) é uma poderosa ferramenta para identificação e classificação dos organismos (WOESE e FOX, 1977; PACE, 1997; SUKASAWAT et al. 2001). Dessa forma, ela tem se tornado o acesso de escolha quando dados fenotípicos são inconclusivos (SUKASAWAT et al., 2001). O tamanho moderado e a conservação da seqüência tornaram o 16S rRNA um bom candidato a estudos de análise filogenética de vários grupos de organismos, quando comparado com outros genes (CHEN et al., 1994).

Neste trabalho, entre os amplímeros seqüenciados da PCR com oligonucleotídeos iniciadores EC3/750F para agentes da Família Anaplasmataceae, uma amostra apresentou a menor similaridade (94,22 %) com amostras depositadas no GenBank para o Gênero *Ehrlichia* spp. Essa amostra apresentava inclusões citoplasmáticas em monócitos e foi PCR positiva para *E. canis*. No dendograma filogenético, essa amostra permaneceu agrupada no “cluster” principal formado com as amostras positivas para *E. canis* deste estudo e amostras depositadas no GenBank escolhidas para formação da árvore filogenética. A probabilidade dessa amostra ser caracterizada como *E. canis* é grande, entretanto, para uma melhor caracterização dessa espécie e poder compará-la com outras espécies depositadas no GenBank, ou até identificar possíveis mutações ou erros na seqüência, seria interessante realizar a análise filogenética de um fragmento maior do gene 16S rRNA e também a utilização de outros genes como: groESL, gltA e rop (subunidade- $\beta$  da RNA polimerase) (DUMLER et al., 2001; TAILLARDT-BISCH et al., 2003). Também a utilização da clonagem de

fragmentos maiores poderia ser realizada para auxiliar na obtenção de fragmentos com melhor qualidade para o seqüenciamento.

Entre as amostras positivas para o agente de *E. canis* deste estudo, a que apresentou maior similaridade (99,67%) com a amostra de *E. canis* da Espanha (nº de acesso no GenBank AY 394.465) apresentou inclusões apenas em monócitos e agrupou-se no “cluster” formado pelas demais amostras positivas para *E. canis* que foram utilizadas para a formação do dendograma. A seqüência do fragmento parcial do gene 16S rRNA da amostra de *E. canis*-padrão de Jaboticabal foi depositada no GenBank sob o número de acesso DQ 401.454.

Na análise de similaridade com as amostras positivas para o genogrupo *A. phagocytophilu*, produtos da PCR com oligonucleotídeos iniciadores gE3a/gE10R, o dendograma filogenético formado apresentou um agrupamento com as nossas amostras de *Anaplasma* sp, e as amostras de *Anaplasma* sp e *A. platys* depositadas no GenBank. Entretanto, duas amostras saíram da clade principal onde agruparam-se a maioria das seqüências juntamente com seqüência de *A. platys* da Venezuela (AF 399.917), da Espanha (AY 530.806) e da Bélgica (AY 821.826). Esse fato poderia ter sido ocasionado por uma baixa qualidade ou diferentes comprimentos dessas seqüências, quando utilizadas para o alinhamento múltiplo na geração do dendograma. É interessante observar que uma dessas amostras apresentou, na citologia, inclusões em monócitos e em plaquetas, porém com a reação de PCR positiva apenas para *A. platys*. A co-infecção entre *A. platys* e *E. canis* poderia estar interferindo no resultado do produto final do seqüenciamento.

Também HEADLEY et al. (2006) relatam que os fragmentos gênicos utilizados foram pequenos quando comparados com aqueles depositados no GenBank, em um estudo de seqüências gênicas dos primeiros relatos confirmados de infecção natural pela *Neorickettsia helminthoeca* em cães no Brasil.

Na Venezuela, foi realizada a primeira caracterização molecular de um isolado humano de *E. canis* idêntico a um isolado de cão (UNVER et al., 2001), demonstrando a importância da caracterização molecular no estudo da epidemiologia das doenças erliquiais.

A caracterização e análise filogenética de bactérias intracelulares podem levar à proposição de um organismo que, genotipicamente, pode ou não ser diferente de outros organismos conhecidos (SUKASAWAT et al., 2001). A principal dificuldade encontrada é a comparação de dados das seqüências do gene 16S RNA obtidas, com aquelas do banco de dados públicos, bem como a avaliação e análise filogenética de seqüências de tamanhos diferentes, e concluir sobre o relacionamento dos organismos estudados. Porém, diferenças podem ser resultados de erros de seqüenciamento ou da PCR e, ainda, a microheterogenicidade entre diferentes operons de rRNA dentro do mesmo organismo (FOX et al., 1992; SUKASAWAT et al., 2001).

Estudos com amostras *E. canis* demonstraram que há conservação gênica e conservação antigênica de algumas proteínas imunorreativas principais, como a p-28 e a gp-140 em isolados norte-americanos. Tais resultados estão sendo utilizados para identificação, caracterização e confirmação de proteínas que poderão ser utilizadas em técnicas diagnósticas sorológicas. Porém, a análise da diversidade genética da *E. chaffeensis* demonstrou a existência de três genogrupos distintos, baseados no gene codificante da proteína de membrana p-28, podendo ser o responsável pela reatividade sorológica variável encontrada entre pacientes humanos com erliquiose monocítica humana (MC BRIDE et al., 2003).

No Brasil, o primeiro relato de *E. chaffeensis* em cervídeos (MACHADO et al., 2006) com diagnóstico molecular (número de acesso no GenBank DQ345.720), associado à descrição de nove pacientes humanos com sorologia positiva para esse agente (COSTA et al., 2006), demonstram a importância do diagnóstico e caracterização molecular das amostras que estão sendo identificadas no Brasil

No presente trabalho, a associação da PCR com o seqüenciamento gênico das amostras estudadas, as quais foram as ferramentas também preconizadas por ANDERSON et al. (1991), auxiliaram na realização do diagnóstico etiológico dos agentes erliquiais e permitiram a análise de similaridade com outras seqüências disponibilizadas no GenBank.

Como a erliquiose e a anaplasmoose canina são uma síndrome altamente variável, podendo mimetizar muitas doenças metabólicas e infecciosas, elas

apresentam dificuldades significativas no diagnóstico diferencial e carecem de critérios diagnósticos padronizados, reagentes comuns e fontes de dados básicos, que possam ser trocados entre laboratórios e clínicos no Brasil.

O conhecimento relacionado com a distribuição geográfica, potencial zoonótico e conseqüências patológicas das infecções erliquiais tem se expandido nos últimos anos. A identificação das espécies de agentes da Família Anaplasmataceae que acometem os cães é importante para a elaboração de medidas de controle dessa doença, evitando, dessa forma, que haja transmissão desses patógenos para os seres humanos que vivem em contato com os animais. A busca de uma técnica de diagnóstico que auxilie na identificação das espécies que estão infectando os cães tem importância fundamental para alcançar esses objetivos. Infecções por agentes erliquiais foram reconhecidas recentemente como zoonóticas e devem ter atenção especial da Saúde Pública, pois casos fatais em seres humanos já foram descritos (DUMLER et al., 1995; WALKER, 2005).

Atualmente, mesmo com o uso de técnicas moleculares, como a PCR e “nested” PCR, falsos negativos podem ocorrer no diagnóstico ou confirmação da infecção em amostras clínicas de animais naturalmente infectados. Da mesma forma, poder-se-ia presumir que resultados falso-negativos podem estar ocorrendo em seres humanos infectados por *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp, em virtude da baixa parasitemia. A PCR também tem sido utilizada na tentativa de resolver problemas como o uso de animais para inoculação, tempo longo de cultivo, resultados falso-negativos em indivíduos imunocomprometidos e baixa sensibilidade das técnicas diagnósticas convencionais (TAMÍ e MAURY-TAMÍ, 2004). Devido a importância zoonótica dos agentes erliquiais, que ainda não estão bem identificados e caracterizados em animais e seres humanos aqui no Brasil, a PCR seguida da caracterização molecular com o seqüenciamento, auxilia no aumento da sensibilidade das técnicas empregadas no diagnóstico da erliquiose.

Embora infecções por *E. canis* sejam relativamente comuns na região de Jaboticabal (OLIVEIRA et al., 2000; NAKAGHI, 2004) até o presente momento, essa é a primeira evidência citológica e molecular do agente *Anaplasma platys* em infecção



única e co-infecção em cães atendidos no Hospital Veterinário da Unesp de Jaboticabal-SP, e a primeira descrição molecular desse agente em Campo Grande-MS.

Durante o período de análise filogenética das seqüências de *Ehrlichia canis* e *A. platys* encontradas neste estudo, nenhuma seqüência pública do GenBank de origem brasileira foi encontrada na análise pelo Blast-n para confronto com as seqüências do gene 16S rRNA obtidas neste trabalho.

A disponibilização pública do genoma completo da *E. canis* (MAVROMATIS et al., 2006) facilita a abordagem de análises de similaridade entre diferentes amostras de várias regiões do mundo e a caracterização de genes específicos.

O seqüenciamento de um maior número de amostras regionais e nacionais será muito importante não só para a confirmação do diagnóstico definitivo, mas também para estudos de caracterização dos isolados encontrados em diferentes regiões brasileiras, permitindo a realização de técnicas diagnósticas com material nativo, e que oligonucleotídeos iniciadores sejam baseados em seqüências de amostras brasileiras e não apenas em seqüências norte-americanas, asiáticas e européias. São auxiliares também os estudos da presença e caracterização gênica dos isolados brasileiros com finalidade para caracterização de proteínas codificadas por tais genes, candidatas a estudos para realização de imunodiagnóstico.

A evolução da Bioinformática possibilitou a análise de seqüências com os programas de alinhamento e análise filogenética, permitindo um resultado mais criterioso das seqüências encontradas. A utilização de métodos e algoritmos de reconstrução filogenética e testes de confiança em topologia em programas computacionais permitem uma análise mais abrangente e com menor possibilidade de erros.

Proteínas principais de superfície, como a MSP (“Major Surface Protein”), apresentam uma expressão diferencial quando sofrem pressão de seleção imune, o que resulta em variabilidade antigênica. Tais proteínas são heterogêneas entre isolados de diferentes regiões geográficas, e essa divergência é importante para a infecção em reservatórios, como roedores, ruminantes e cervídeos (SCORPIO et al., 2004). Amostras de *A. phagocytophilum* de diferentes regiões geográficas apresentaram

variabilidade antigênica (CASPERSEN et al., 2002). Esta variabilidade antigênica demonstrada “in vivo” e “in vitro” sugere relação com possíveis mecanismos de evasão imune e persistência de infecção (BARBET et al., 2000).

Uma caracterização molecular de agentes erliquiais encontrados em amostras oriundas de vetores ixodídeos, associada a um maior número de amostras de diferentes regiões brasileiras isoladas em diferentes hospedeiros vertebrados naturais e silvestres, poderia criar uma caracterização molecular mais abrangente e definitiva, auxiliando na análise de variantes antigênicas.

Associado a isso, a análise de vários genes e com fragmentos maiores e uma análise de polimorfismo de fragmentos obtidos com enzimas de restrição específicas poderiam auxiliar e complementar os resultados dessas análises.

## 7. CONCLUSÕES

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

1. A detecção direta pela microscopia óptica de inclusões citoplasmáticas em leucócitos e plaquetas, pode auxiliar na suspeita do diagnóstico de infecções agudas causadas por agentes da Família Anaplasmataceae;

2. A diversidade encontrada na morfologia, tamanho, coloração e localização dessas inclusões demonstrou que toda a identificação citológica desses agentes deve ser realizada com atenção e por pessoal devidamente treinado, associada à PCR para um diagnóstico conclusivo e definitivo;

3. A PCR, associada ao seqüenciamento, permitiu a confirmação dos amplicómeros obtidos das amostras de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* encontradas infectando os cães deste estudo;

4. O agente *A. platys* está presente na região de Jaboticabal-SP e de Campo Grande -MS;

5. O agrupamento filogenético, pelo estudo do fragmento do gene 16S rRNA das seqüências obtidas, permitiu iniciar uma caracterização parcial das espécies *E. canis* e *A. platys* obtidas neste estudo;

6. A *E. canis* encontrada nas amostras desse estudo pertencem ao subtipo *vogeli*.

## 8. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, E.A.; SIANZ, A.; DUNNER, S.; AMUSATEGUI, I.; LÓPEZ, L.; RODRIGUEZ-FANCO, F.; LUACES, I.; CORTÉS, O.; TESOURO, M.A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 365-372, 2004.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; RUIZ, L.; AMUSATEGUI, I.; SIANZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 53, p. 197-200, 2006.

ALLSOPP, M.T.E.; ALSOPP, B.A. Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 4204-4207, 2001.

AMORIN, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2002. 156 p.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J.E.; JONES, D.C.; WILSON, K.H. *Ehrlichia chaffeensis*, a New Species Associated with Human Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 12, p. 2838-2842, 1991.

BAKKEN, J.S.; KRUETH, J.; WILSON-NORDSKOG, C.; TILDEN, R.L.; ASANOVITCH, K.; DUMLER, J.S. Clinical and Laboratory Characteristics of Human Granulocytic Ehrlichiosis. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 275, n. 3, p. 199-205, 1996.

BARBER, L.; EGAN, J.J.; TUNER, A.J.; GUIVER, M.; WOODCOCK, A.A.; YONAN, N.; DEIRANIYA, A.K.; FOX, A.J. The development of a quantitative PCR-ELISA to determine HCMV DNAemia levels in heart, heart/lungs and lung transplanted recipients. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 85-97, 1999.

BARBET, A.F.; LUNDGREN, A.; YI, J.; RARANGIRWA, F.R.; PALMER, G.H. Antigenic of the ehrlichia *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 sequence mosaics. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 6133-6138, 2000.

BARNEWALL, R.; OHASHI, N.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the Human Granulocytic Agent, colocalize with transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2258-2265, 1999.

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

BOJERSSON, D. Ehrlichiosis: new perspectives on pathogenesis and diagnosis. In: 18<sup>th</sup> AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE-**ACVIM**, 2000, Seattle. Proceedings...

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Doxycycline treatment and challenge infection with two *Ehrlichia canis* strains. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 11, n. 2, p. 132, 1997.

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

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Length Polymorphism Analysis on Amplified Small Subunit Ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CASPERSEN, K.; PARK, J-H.; PATIL, S.; DUMLER, J.S. Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophila* msp2 (p44). **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1230-1234, 2002.

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

CHAE, J-S.; KIM, E-H.; KIM, M-S.; KIM, M-J-.; CHO, Y-H.; PARK, B-K. Prevalence and sequence analyses of *Neorickettsia risticii*. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 990, p. 248-256, 2003.

CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S.; WALKER, D.H. Identification of a Granulocytotropic *Ehrlichia* Species as the Etiologic Agent of Human Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 589-595, 1994.

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

COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA JUNIOR, J.A.; GUIMARÃES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos Escola Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, v. 25 n. 2, p. 199-200, 1973.

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

COUTO, C.G. It's a coagulopathy. But couldn't it be ehrlichiosis? In: FOURTH EUROPEAN FECAVA-SCIVAC CONGRESS, 1998. **Proceedings**...European FECAVA-SCIVAC Congress, 1998. p. 135-136.

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

DAGNONE, A.S. **Soroepidemiologia e avaliação citológica e molecular da infecção por *Ehrlichia* sp em cães de uma população hospitalar**. 2002. 131 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H. S A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 191-201, 2001.

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

DAGNONE, A.S.; BRUM, A.M.; SEIKI, M.C.; PASCON, J.P.E.; FARIA, J.L.M.; SILVA, V.L.D.; SANTANA, A.E.; TINUCCI-COTS, M.; MACHADO, R.Z. Diagnóstico molecular da erliquiose canina. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 13, p. 354, 2004.

DALY, P.; DOYLE, S. The development of a competitive PCR-ELISA for the detection of equine herpesvirus-1. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 107, p. 237-244, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

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

DAWSON, J.E.; STALLKNECHT, D.E.; HOWERTH, E.W.; WARNER, C.; BIGGIE, K.; DAVIDSON, W.R.; OLSON, J.G.; CHILDS, J.E. Susceptibility of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) to Infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the Etiologic Agent of Human Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 11, p. 2725-2728, 1994.

DAWSON, J.E.; WARNER, C.K.; STANDAERT, S.; OLSON, J.G. The Interface Between Research and the Diagnosis of an Emerging Tick-borne Disease, Human Ehrlichiosis Due to *Ehrlichia chaffeensis*. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 156, p. 137-142, 1996.

De LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; CARACAPPA, S.; DI MARCO, V.; ALONGI, A.; RUSSO, M.; MAGGIO, A.R.; KOCAN, K.M. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: Case Report. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Washington, v. 4, p. 15, 2005.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin Société Pathologie Exotique, Siege de la société: Institut Pasteur**, Paris, Masson & Cie., Éditeurs, Libraires de L'Académie de Medicine, p. 418-419, 1935.

DOOLITTLE, W.F. Phylogenetic classification and the universal tree. **Science**, Washington, v. 284, p. 2124-2128, 1999.



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

DUGAN, V.G.; GAYDOS, J.K.; STALLKNECHT, D.E.; LITTLE, S.E.; BEALL, A.D.; MEAD, D.G.; HURD, C.C.; DAVIDSON, W.R. Detection of *Ehrlichia* spp in raccoons (*Procyon lotor*) from Georgia. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 5, n. 2, p. 162-171, 2005.

DUMLER, J.S.; ASANOVICHK.M.; BAKKEN, J.S.; RITCHER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J.E. Serologic Cross-Reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, 1995.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: inification 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, p. 2145-2165, 2001.

DUPLESSIS, J.L.; FOURIE, N.; NEL, P.W.; EVEZARD, D.N. Concurrente babesiosis and ehrlichiosis n the dog: blood smear examination supplemeted by the indirect fluorescent antibody test, using *Cowdria ruminatium* as antigen. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, n. 57, p. 151-155, 1990.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 33, p. 540-543, 1991.

ENGENVALL, E.O.; PETTERSSON, B.; PERSSON, M.; ARTURSSON, K.; JOHANSSON, K.E. A 16S rRNA-Based PCR Assay for Detection and Identification of Granulocytic Ehrlichia Species in Dogs, Horses, and Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 9, p. 2170-2174, 1996.

EWING, S.A.; BUCKNER, P.G. Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infections in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 26, n. 113, p. 815-828, 1965.

EWING, S.A.; DAWSON, J.E.; PANCIERA, R.J.; MATHEW, J.S.; PRATT, K.W.; KATAVOLOS, P.; TELFORD III.S.R. Dogs Infected with a Human Granulocytotropic *Ehrlichia* spp (Rickettsiales: Ehrlichiae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 34, n. 6, p. 710-718, 1997.

EWING, S.A.; ROBERSON, W.R.; BUCKNER, P.G.; HAYAT, C.S. A new Strain of *Ehrlichia canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 159, n. 12, p. 1771-1774, 1971.

FARIA, J.L.M. **Estudo comparativo de detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue total e em aspirado de baço pelo “nested” PCR em cães naturalmente infectados**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2006.

FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Ed). **Schalm's Veterinary Hematology**. 5<sup>o</sup>ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.

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

FURUTA, P.Y.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROCHA, A.G.; TINUCCI-COSTA, M. Padronização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA-TESTE) para a detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 231, 2004.

GALE, K.R.; DIMMOCK, C.M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: Detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 2, n. 10, p. 1103-1109, 1996.

GARCIA-MARTINEZ, J.; BESÇOS. I.; RODRIGUEZ-SALA, J.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 1, 2001.

GIOVANONNI, S.L.; DeLONG, E.F.; OLSEN, G.J.; PACE, N.R. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, n. 170, p. 720-726, 1988.

GRAUR, D.; LI, W.H. **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2<sup>nd</sup>.ed. Sinauer Associates, 1999.

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

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

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

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

HARRUS, S.; KENNY, M.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a Rickettsia-Like Agent in Dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HEADLEY, S.A.; SCORPIO, D.G.; BARAT, N.C.; VIDOTTO, O.; DUMLER, J.S. *Neorickettsia helminthoeca* in dog, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 8, p. 1303-1305, 2006.

HEEB, H.L.; WILKERSON, M.J.; CHUN, R.; GANTA, R.R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 39, p. 379-384, 2003.

HIGGINS, J.A.; AZAD, A.F. Use of Polymerase Chain Reaction To Detect Bacteria in Arthropods: A Review. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 32, n. 3, p. 213-222, 1995.

HILDEBRANDT, P.K.; CONROY, J.D.; McKEE, A.E.; NYINDO, M.B.A.; HUXSOLL, D.L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 7, n. 2. p. 265-271, 1973.

HOTOPP, J.C.D. ; LIN, M.; MADUPU, R.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S.V.; EISEN, J.; SESHADRI, R.; REN, Q.; WU, M.; UTTENBACK, T.R.; SMITH, S.; LEWIS, M.; KHOURI, H.; ZHANG, C.; NIU, H.; LIN, Q.; OHASHI, N.; ZHI, N; NELSON, W.; BRINKAC, L.M.; DODSON, R.J.; ROSOVITZ, M.J.; SUNDARAM, J.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.; DURKIN, A.S.; GWIN, M.; HAFT, D.H.; SELENGUT, J.D.; SULLIVAN, S.A.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; BENAHMED, F.; FORBERGER, H.; HALPIN, R.; MULLIGAN, S.; ROBINSON, J.; WHITE, O.; RIKIHISA, Y.; TETTELIN, H. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. **Public Library of Science Genetics**, San Francisco, v. 2, n. 2, p. 0208-0223, 2006.

HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 44, n. 9, p. 737-739, 2000.

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

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; WALKER, J.S. Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3031-3039, 2001.

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

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

IQBAL Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from Blood and Tissues of Dogs after Doxycycline Treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1644-1649, 1994b.

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

KAKOMA, I.; HANSEN, R.D.; ANDERSON, B.E.; HANLEY, T.A. ; SIMS, K.G.; LIU, L.; BELLAMY, C.; LONG, M.T.; BAEK, B.K. Cultural, Molecular, and Immunological Characterization of the Etiologic Agent for Atypical Canine Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 1, p. 170-175, 1994.

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

KAVINSKI, L.C. Ocorrência de um caso ehrlichiose canina em Curitiba-PR. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1-2, p. 217-219, 1988.

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

KOCAN, 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.

KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; MacCORMACK, J.N. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2631-2638, 1999.

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

LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 13, p. 123-124, 2004.

LEE, S.O.; NA, D.K.; KIM, C.M.; LI, Y.H.; CHO, Y.H.; PARK, J.H.; LEE, J.H.; EO, S.K.; KLEIN, T.A.; CHAE, J.S. Identification and prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* infection in *Haemophysalis longicornis* ticks from Korea by PCR, sequencing and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 6, n. 2, p. 151-155, 2005.

LESTER, S.J.; BREITSHWERDT, E.B.; COLLIS, C.D.; HEGARTY, B.C. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 4, p. 825-827, 2005.

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

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

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA ADE, M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, p. 44-48, 2005.

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

MAGNARELLI, L.A.; STAFFORD III, K.C.; MATHER, T.N.; YEH, M.T.; HORN, K.D.; DUMLER, J.S. Hemocytic Rickettsia-Like Organisms in Ticks: Serologic Reactivity with Antisera to *Ehrlichia* and Detection of DNA of Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2710-2714, 1995.

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



MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; PINEDA, J.A.; ANDREU-LOPEZ, M.; DELGADO, J.; MACÍAS, J.; deLa ROSA, R.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 96, n. 7, p. 669-671, 2002.

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

MAVROMATIS, K.; K.; DOYLE, C.K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M.P.; CHAIN, P.; SHIN, M.; MALFATTI, S.; LARIMER, F.; COPELAND, A.; DETTER, J.C.; LAND, M.; RICHARDSON, P.M.; YU, X.J.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; KYRPIDES, N.C. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 4015-4023, 2006.

Mc BRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; BOUDEAUX, C.B.; GUEDRY, T.; WALKER, D.H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2516-2524, 2003.

MENESES, A. Diagnostico de ehrlichiosis canina por medio de cuerpos de inclusion y morula. **Ciencias Veterinarias** (Costa Rica), Heredia, v. 20, n. 1-2, p. 57-63, 1997.

MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; GONÇALVES, J.S.A.; VIDOTTO, O. Risk factors in the hemogram of dogs seropositive for *Babesia canis* and *Ehrlichia canis*. A hospital population study in South Brazil. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, n. 17, p. 422, 2003.

MURAMATSU, Y.; IKEDA, E.; MORITA, C.; TAMURA, Y. Detection of Ehrlichial DNA in small rodents captured in a woodland area of Hokkaido, the Northernmost Island of Japan, where Lyme Disease is endemic. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, n. 58, p. 316-319, 2005.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, 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 ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparasion between five methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 91, p. 197-204, 2003.

NAKAGHI, A.C.H. **Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *Ehrlichia canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose**. 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the infectious Disease Study Group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, p. 309-315, 2002.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J.L.; CARSON, C.A.; STEPHENSON, E.H. Cell-Mediated and Humoral Immune Responses of German Sheperd Dogs and Beagles to Experimental Infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C.T.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados, através do "DOT-ELISA". **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 1, n. 9, p. 1- 6, 2000.

ORÍÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-Blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis***. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista , Jaboticabal - SP, 2001.

PACE, N.R. A molecular view of microbiology diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PASSOS, L.M.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 231, 2004.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

PERSING, D.H. **PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. A supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications.** Washington, D.C.: ASM Press, 1996. 180 p.

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

POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; FENG, H.M.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R.B.; WALKER, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, Londron, v. 47, n. 3, p. 235-51, 1998.

PREOZI, D.E.; COHN, L.A. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 24, n. 4, p. 277-288, 2002.

PRODOSCINI, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNECK, E.; SILVA, A.F.; REIS, A.N.; MARTINS, A.C.; SANTOS, A.C.F.; JUNIOR, A.N.; WUST, C.I.; FILHO, F.C.; KESSEDJIAN, J.L.; PETRETSKI, J.H.; CAMARGO, L.P.; FERREIRA, R.G.M.; LIMA, R.M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V.S.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V. Bioinformática-Manual do Usuário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 13-25, 2002.

RELMAN, D.A. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.). **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications.** Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1993. p. 489-495.

RIKIHISA, Y. Mechanism to create a safe haven by members of the Family Anaplasmataceae. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, n. 990, p. 548-555, 2003.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 95-101, 2006.

SANTOS, A.S.; SANTOS-SILVA, M.M.; ALMEIDA, V.C.; BACELLAR, F.; DUMLER, J.S. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setúbal District, Mainland, Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 9, p. 1643-1648, 2004.

SARIH, M.; M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A.; GERN, L.; BARANTON, G.; POSTIC, D. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1127-1132, 2005.

SCORPIO, D.G.; CASPERSEN, K.; OGATA, H.; PARK, J.; DUMLER, J.S. Restricted changes in major surface protein-2 (msp-2) transcription after prolonged in vitro passage of *Anaplasma phagocytophilum*. **BioMedCentral Microbiology**, London, n. 4, p. 1-8, 2004.

SEIBERT, M.; SILVA, N.R.S.; CHAPLIN, E.L.; ARAÚJO, F.A.P. Ocorrência de *Ehrlichia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em cães conduzidos ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n. 2, p. 84-94, 1997.

SILVA, V.L.D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológico e histopatológico da medula óssea, na erliquiose canina aguda: estudo experimental.** 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária

Experimental e Comparada)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVEIRA, J.M.; RIBEIRO, O.C.; SILVEIRA, A.C.; LOPES, R.S.; BARROS, N. Patologia e clínica da ehrlichiose canina no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, 1984, Belém. **Anais...** Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, Sociedade dos Médicos Veterinários do Pará, 1984.

SIMPSON, C.F. Structure of *Ehrlichia canis* in blood monocytes of a dog. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 33, n. 12, p. 2451-2454, 1972.

SIRIGIREDDY, K.R.; GANTA, R.R. Multiplex detection *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real -time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 308-316, 2005.

SOUZA, A.I.; DAGNONE, A.S.; MACHADO, R.Z. Infecção por *Anaplasma platys* em cães de Campo Grande-MS, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 13, p. 352, 2004.

SUKASAWAT, J.; HEGARTY, B..C; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 14, p. 50-55, 2000.

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

TAILLARDT-BISCH, A.V.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. RNA polymerase  $\beta$ -subunit-based phylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 455-458, 2003.

TAMÍ, I.C.; TAMÍ-MAURY, I.M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

TENG, C.H.; PALANIAPPAN, R.U.M.; CHANG, Y.F. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein located to the morula membrane. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 4, p. 2218-2225, 2003.

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.

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

UILENBERG, G.; THIAUCOURT, F.; JONGEJAN, F. On Molecular Taxonomy: What is in a name? **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n. 32, p. 301-312, 2004.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparasion of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, n. 39, p. 2788-2793, 2001.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes for Analysis of fungal community composition. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 127, p. 5999-6004, 2002a.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.J.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of r RNA genes. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3243-3250, 2002b.

WALKER, D.H. *Ehrlichia* under our noses and no one notices. **Archives of Virology. Supplementum**, New York, v. 19, p. 147-156, 2005.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the Ehrlichioses as Human Health Problems. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, january-march, 1996 [on line].

WANER, C.K.; DAWSON, J.E. Genus and Species-level identification of *Ehrlichia* Species by PCR and Sequencing. In: PERSING, D.H (Ed.). **PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. A supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. ASM Press. Washington, 1996, p. 100-105.

WANER, C.K.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 95, p. 1-15, 2001.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of "nested" PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with



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

WILSON, K.H.; BLITCHINGTON, R.B.; GREENE, R.C. Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 9, p. 1942-1946, 1990.

WHITFIELD, J.B.; CAMERON, S.A. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, n. 12, p. 1728-1743, 1998.

WISCONSIN STATE UNIVERSITY. Microtextbook. Disponível em: <<http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?name=Sections&req=viewarticle&artid=23&page=1>>. Acesso em: 15 mai. 2006.

WOESE, C.R.; FO X, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of National Academy of Sciences. USA**, New York, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial Diseases of Dogs. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 75-99, 1991.

YAMAMURA, M.H.; VIDOTTO, O. Prevalência de hemoparasitos em cães da região norte do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1982, Balneário Camboriú, Brazil. **Anais...** Camboriú, 1982, p. 196.

A apresentação das citações de Referências foi realizada conforme as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – NR 6023, Agosto /2002.

## 9. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

9.1 “Detection of Anaplasmataceae agents DNA in dog blood samples with intracellular inclusions from Jaboticabal -SP and Campo Grande - MS, Brazil. “

9.2 “Phylogenetic study of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* organisms found in dog blood samples from Brazil”.

## APÊNDICES

## A. Lista de reagentes

PRODUTO	MARCA
Acetato de sódio	F.Maia
Ácido Bórico- $H_3BO_3$ P.M. 61,83	GybcoBRL
Ácido Clorídrico-HCl (P.A.)	Synth
Ácido EtilenodiaminotetraacéticoSal dissódico-EDTA (P.A.) $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ P.M. 372,24	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
Álcool Etilíco absoluto (P.A.)	Synth
Álcool Isopropílico	Synth
Álcool Metílico (P.A.)	Synth
Azul de Bromofenol	Sigma
Azul de Eosina e Azul de Metileno –Giemsa -pó	Synth
Big Dye <sup>†</sup> Terminator V3.1 9 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Brometo de Etídeo $C_{21}H_{20}N_3Br$	Invitrogen
Cloreto de Sódio NaCl (P.A.)	J.T.Baker
Cloreto de Magnésio	Carlo Erba-Analyticals
DATP Solução 100 mM	Invitrogen
dCTP Solução 100 mM	Invitrogen
dGTP Solução 100 mM	Invitrogen
dTTP Solução 100 mM	Invitrogen
DNA Ladder – 100 pares de bases	Invitrogen
Enzimas de restrição	
- <i>Ava</i> I	Biolabs
- <i>Eco</i> NI	Biolabs
- <i>Bpm</i> I	Biolabs
- <i>Taq</i> I	Invitrogen
- <i>Hinf</i> I	Invitrogen
Ficol	Syigma
Formamida Hi-Di Abi-Prism	Applied Biosystems
Glicerol	Lab Synth
Hidroximetilaminometano- TRIS	Invitrogen
Low DNA Mass ladder	Invitrogen
Oligonucleotídeos Iniciadores 8F 18 bases	Invitrogen
1447R -21 bases	
Oligonucleotídeos Iniciadores	Invitrogen

---

ECC -20 bases	
ECB -21 bases	
Oligonucleotídeos Iniciadores	Invitrogen
GA1UR -21 bases	
Oligonucleotídeos Iniciadores	Invitrogen
chaf.-29 bases	
Oligonucleotídeos Iniciadores	Invitrogen
can - 28 bases	
Oligonucleotídeos Iniciadores	Invitrogen
gE3A -25bases	
gE10R -25 bases	
gE2 -24 bases	
gE9F -25 bases	
Oligonucleotídeos Iniciadores	Invitrogen
Platys f-20 bases	
Platys r-17 bases	
Papel para impressora (P90W/P91W/P68)	Mitsubishi
Mod. K65HM-CE	
Placa 96 wells em PP não estéril	Greiner Bio-One
PP- PCR plate -Mil Halben Rand Für ABI	
Platinum Pfx DNA Polimerase	Invitrogen
QIAamp-DNA Blood Mini Kit (50)	Qiagen
QIAquick- Gel purification Purification Kit (50)	Qiagen
QIAquick-PCR purification Purification Kit (50)	Qiagen
Taq. DNA Polimerase recombinante	Invitrogen
Vent <sub>r</sub> DNA Polymerase	Biolabs

---

## B. Lista de equipamentos utilizados

1. Agitador magnético/Aquecedor: Stirrer /Hotplate (Cornig™)
2. Agitador de tubos: vórtex - modelo AP 56 (Phoenix™)
3. Aparelho deionizador: milliQ-Milli pore –Simplicity
4. Aparelho de leitura de Gel - UV: Stratagene Eagle Eye II / P W/Mini Câmera Computer/
5. Balança digital: FA2004 (Coleman Equipamentos®)
6. Banho-Maria: (Nova Ética®)
7. Banho seco: Dry Bath Incubator (Boeckel Scientific™)
8. Bio-espectrofotômetro 8,5mm light center (Eppendorf™)
9. Bomba de Vácuo: Bomba de Alto Vácuo (Eduards™)
10. Centrífuga de placas :Rotanta 46 R (Hettich-Zentrifuger™)
11. Centrífuga de placas Refrigerada: Rotina 46 R (Hettich-Zentrifuger™)
12. Centrífuga: Mini Spin (Eppendorf™)
13. Centrífuga: Mini Spin (BioAgency™)
14. Cuba horizontal de eletroforese: Max Horiz. Sub. W (Amershan™)
15. Estufa: com fluxo úmido (Nova Ética®)
16. Fluxo laminar: Capela Germicida (Veco®)
17. Fonte: Power pac 1000 (Biorad™)
18. Forno de microondas: Multiondas – MODELO MS-74mL (LG®)
19. Freezer -20°C : F220 (Electrolux®)
20. Freezer -80°C (Revco/ Legaci™ Refrigerator System)
21. Impressora de foto de Gel: Vídeo Copy Processor modelo P-68E (Mitsubishi™)
22. Jogo de pipetas para extração de DNA: Pipet Lite (Raini™)
23. Jogo de pipetas para PCR: (Eppendorf™)
24. Leitor de pH: pHmetro (Digimed®)
25. Microscópio Óptico de Luz: Alphaphot -2 YS2 (Nikon™)

26. Microscópio Óptico - leitura digital: Modelo U-MDO10B (Olympus Optical Co. <sup>TM</sup>)
27. Refrigerador: Biplax (Cônsul<sup>®</sup>)
28. Tampa adesiva -Thermowell Sealing Tape for 96 well plates Alumimium (Cornig<sup>®</sup> - Costar- 6570)
29. Tampa de silicone (Applied Biosystems<sup>TM</sup>)
30. Sequenciador: 3100 Hitachi Genetic Analyser ABI PRISM (Applied Biosystems<sup>TM</sup>)
31. Termociclador: DNA Engine Gradiente Cyclor -Peltier Thermal Cyclor –Modelo PTC-200 (MJ Reasearch<sup>TM</sup>)
32. Termociclador: Programmable Thermal Controller - Peltier Effect Cycling Cyclor Modelo PTC-100 (MJ Reasearch<sup>TM</sup>)

### C. Lista de Programas (“Softwares”) utilizados

1. Programa de Leitura de fotos de gel: **Strategene™**
2. Programa de Leitura de Lâminas: **Software Image ProPlus™**
3. Programa de Leitura de Seqüências: **ABI PRISM™**
4. Programa de Análise e criação de oligonucleotídeos iniciadores: **Gene Runner™**
5. Programa de Análise de enzimas de restrição: **Gene Runner™**
6. Programa de Análise de Eletroferogramas: **CromasLite** (Version 2.0, Copyright © 1998-2004 Technelysium Pty Ltd).
7. Programa de Análise e comparação de seqüências de DNA: **BLAST** (<http://> (BENSON et al., 2002).
8. Programa de Análise e comparação de seqüências de DNA: **BioEdit**
9. Programa de Análise e filogenia de seqüências de DNA: **TreeVIEW**
10. Programa de alinhamento e comparação de seqüências de DNA: **Clustal-X** (THOMPSON et al., 1997)
11. Programa de alinhamento e análise filogenética: **MEGA-2** (Phylogenetic and Molecular Evolutionary Analyses - MEGA version 2.1) (KUMAR et al., 2001).



## D. Protocolos de Citologia

### Equipamentos

- Centrífuga: Mini Spin (Eppendorf™)
- Microscópio óptico de Luz (Alphaphot -2 YS2 Nikon™)
- Microscópio óptico de luz acoplado a computador Modelo U-MDO10B (Olympus Optical Co.™)
- Programa para obtenção de fotos das lâminas **Software Image ProPlus™**

### Reagentes utilizados

- Álcool Metílico (Synth®) PM= 32,04
- Azur de Eosina-Azul de Metileno – Giemsa (Synth®) pó
- Glicerina pura
- Água destilada

### Preparo da Solução de Giemsa

- Giemsa em pó ..... 3 gramas
- Álcool Metílico ..... 375 mL
- Glicerina pura ..... 125 mL

Triturar o pó de Giemsa em um graal com a glicerina aquecida (60°C), adicionar a álcool metílico. Colocar em recipiente escuro e deixar incubar na estufa (37°C) durante 7 dias, agitando 2-3 vezes ao dia. Filtrar em papel de filtro duas vezes, e armazenar em vidro âmbar.

### Preparo da coloração de Giemsa

- . Preparar aproximadamente 5 mL de mistura de água destilada+ água de torneira por lâmina
- . Adicionar em uma proveta para cada mL de água destilada: 2 gotas de Giemsa-solução
- . Colocar lâmina invertida sob apoio e colocar o corante. Aguardar 25-30 minutos
- . Lavar o verso da lâmina com água corrente
- . Secar em pé sobre papel absorvente

### Preparo da papa de leucócitos e esfregaço sangüíneo

- . Centrifugação de sangue total com EDTA a 870 x g por 10 minutos em tubo de vácuo de 10 mL
- . Remoção do plasma
- . Obtenção da camada rica em leucócitos (papa de leucócitos)
- . Secar por 3-5 minutos
- . Fixar com Metanol por 3 minutos

## E. Protocolos de Biologia Molecular

### Extração de DNA

#### Reagentes utilizados

- Álcool Etílico (Synth<sup>®</sup>) PM= 32,04
- QIAamp - DNA Blood Mini Kit (50) (Qiagen<sup>®</sup>)

1. Equilibrar amostras à temperatura ambiente
2. Pré-aquecer Banho-Maria ou Banho-seco a 56° C
3. Incubar o **Buffer AL** a 56° C se apresentar precipitados
4. Amostra de sangue total com EDTA de 200 µL → 3-12 µg DNA extraído

#### Protocolo

1. Em tubo de 1,5 mL colocar 20 µL de **Protease** (Qiagen<sup>®</sup>)
2. Adicionar 200 µL de sangue total com EDTA ao tubo (pode ser plasma, soro, papa leucócitos ou fluidos corporais).
3. Adicionar 200 µL de **BUFFER AL**
4. Vortexar amostra por 15 segundos
  - amostra > 200µL adicionar proteinase proporcional
5. Incubar a 56°C por 10 minutos
6. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) por 30 segundos
7. Adicionar 200 µL de **ETANOL (96-100%)**
8. Vortexar amostra por 15 segundos
9. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) por 30 segundos
10. Colocar a solução em uma "Spin Column" colocada em um tubo limpo
11. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto
12. Colocar a spin column em novo tubo identificado. Descartar o filtrado.
13. Adicionar 500 µL de **BUFFER AW1**
14. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto

15. Colocar a “Spin column” em novo tubo identificado. Descartar o filtrado
16. Adicionar 500  $\mu$ L de **BUFFER AW2**
17. Centrifugar a 14000 rpm (20000 x g) por 1 minuto
18. Colocar a spin column em novo tubo identificado. Descarte o filtrado
19. Adicionar 200  $\mu$ L de **BUFFER AE** ou H<sub>2</sub>O destilada estéril
20. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
21. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto
22. Descartar a spin column
21. Colocar o **SOBRENADANTE** (filtrado) em um tubo de polipropileno de 0,6mL estéril identificado.
22. O DNA extraído deve ser mantido a -20°C até a sua utilização. Caso este DNA demore a ser utilizado, o ideal é que seja estocado em freezer à -80°C para evitar degradação.

### **Tampão Tris-EDTA-Ácido bórico (TEB)**

#### **Reagentes utilizados**

- Ácido Bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) P.M. 61,83 (GybcobRL<sup>®</sup>)
- Ácido Clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Synth<sup>®</sup>)
- Ácido etilenodiaminotetraacético sal dissódico- EDTA, P.A. (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) P.M. 372,24 (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Invitrogen<sup>®</sup>)

#### **Preparo da Solução de TEB 10 X    pH= 8,4**

- |   |          |
|---|----------|
| - Hidroximetil amino metano - TRIS .....        | 107,78 g |
| - Ácido bórico .....                            | 55,03 g  |
| - Ácido etilenodiaminotetraacético - EDTA ..... | 7,45 g   |
| - Água destilada q.s.p .....                    | 1000 mL  |

**Preparo do TEB 1 X**

- TEB 10 X ..... 100 mL
- Água destilada ..... 900 mL

**Tampão de amostra****Reagentes utilizados e Preparo da Solução**

- Azul de bromofenol ..... 0,02 g
- Glicerol ..... 2,0 mL
- TRIS-HCl 0,1M (pH 6,9) ..... q.s.p. para 100,0 mL

Misturar sob agitação leve, todos os reagentes, aliquotar em tubos de polipropileno estéreis e estocar a -20° C.

**Obs:** Preparo do Tris-HCl a 0,1M e pH= 6,9

Pesar 1,2114 gramas do Hidroximetil amino metano - TRIS, e dissolver sob agitação com +/- 80 mL de Água destilada. Acertar o pH para 6,9 e completar o volume para 100 mL.

**Diluição do Marcador de tamanho molecular 100bp****Reagentes utilizados**

- DNA Ladder - 100 pares de bases (Invitrogen®)
- H<sub>2</sub>O ultra pura estéril

**Preparo (em gelo)**

Solução original na concentração de 1µg/µl

Solução de trabalho = diluir a solução estoque 1:10 que passará a 0,1µg/µl.

Usar entre 8-10 µl dessa solução de trabalho + 2 µl do tampão de amostra.

## Diluição dos Oligonucleotídeos iniciadores

### Reagentes utilizados

- Oligonucleotídeo Iniciador liofilizado (Invitrogen®)
- H<sub>2</sub>O ultra pura estéril

### Preparo (em gelo)

Normalmente a solução estoque é reconstituída a 1.000  $\mu\text{mol}$  (ou pmoles). O oligo vem com uma concentração em nmoles descrita pelo fabricante. A concentração desejada para a Solução Estoque-mãe é de 200  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ . A solução de uso é de 20  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ .

- **Solução estoque** (200  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )
- **Solução de uso** (20  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )

### Preparo do “MIX” dos dNTP’s

#### Reagentes utilizados

- dATP Solução 100 mM (Invitrogen®)
- dTTP Solução 100 mM (Invitrogen®)
- dCTP Solução 100 mM (Invitrogen®)
- dGTP Solução 100 mM (Invitrogen®)
- H<sub>2</sub>O ultra pura estéril

### Preparo (em gelo)

Solução estoque a 100Mm de cada (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Invitrogen®)

- **Solução estoque -MIX** (100 mM): adicionar em tubo de polipropileno 25  $\mu\text{L}$  de cada dNTP
- **Solução de uso -MIX 1X** [ ] (10 mM)

### Preparo do Gel de Agarose (com luvas)

1. Pesar a Agarose de acordo com a [ ] do gel e colocar em erlenmeyer
2. Adicionar 75mL de **TEB 1 X** [ ]
3. Pesar a solução (anotar no frasco)
4. Fundir no microondas por 1 a 2 minutos
5. Pesar novamente e completar o volume inicial com TEB 1 X [ ]
6. Esfriar (temperatura morna)
7. Acrescentar 25  $\mu$ L **Brometo de Etídeo** (geladeira) Brometo[ ]= 1mg/mL
8. Colocar na forma para o gel
9. Retirar as bolhas
10. Gelificar por +/- 30 minutos

	2 %	1,5 %	1,3%	1,2 %
Agarose (g)	1,5	1,125	0,96	0,72
TEB1X(mL)	75	75	75	75

## Extração de amplímeros de Gel de Agarose

### Solução de Acetato de Sódio 3M, pH = 5,0

- Acetato de Sódio 3x H<sub>2</sub>O ..... 36,936 g
- H<sub>2</sub>O destilada ..... q.s.p 150,0 mL

Misturar sob agitação leve todos os reagentes, alíquotar em tubos de polipropileno estéreis e estocar a -20°C.

### Protocolo

1. Usar óculos com proteção anti-UV para cortar o fragmento de DNA (amplímero) do Gel de Agarose sob UV ligada, usando uma lâmina de bisturi estéril, minimizando a fatia o máximo possível para remover a agarose extra.
2. Pesar o fragmento em um tubo de polipropileno de 2,0 mL
3. Adicionar 3 Volumes de **BUFFER QG** a 1 Volume de gel (corresponder: 100 mg é ~100 µL).
4. Incubar a 50°C por 10 minutos (ou até que o gel se dissolva completamente). Misturar vortexando o tubinho a cada 2-3 minutos durante esta incubação, para ajudar na dissolução do gel.

**Importante:** Solubilizar a agarose completamente. Para gel >2%, aumentar o tempo de incubação.

5. Após a dissolução do gel completamente, checar a cor da mistura, que deverá ser amarela (~ ao buffer QG).

Se a cor da mistura estiver alaranjada ou violeta, adicionar 10µL de Acetato de sódio 3M (pH=5,0) e misturar. A cor da mistura irá então virar para o amarelo.

A adsorção do DNA a membrana do Quiaquick é eficiente apenas no pH  $\leq 7,5$ . O Buffer QG contém indicador de pH o qual é amarelo a pH  $\leq 7,5$  e laranja ou violeta a pH mais altos, permitindo uma determinação fácil do pH ótimo para a ligação do DNA.

6. Adicionar 1 volume do gel de Isopropanol 100% a amostra e misturar. Não centrifugar a amostra neste passo.
7. Colocar a “Spin column” em um tubinho novo de 2,0 mL

8. Aplicar a amostra diretamente sobre a “Spin column”.
9. Centrifugar: 13.000 rpm (~17.900 x g) por 1 minuto.
10. Descartar o sobrenadante, e colocar a coluna o mesmo tubo.
11. Adicionar 500  $\mu$ L de **BUFFER QG** a coluna
12. Centrifugar: 13.000 rpm (~17.900 x g) por 1 minuto.
13. Descartar o sobrenadante, e colocar a coluna no mesmo tubo.
14. Adicionar 750  $\mu$ L de **BUFFER PE** à coluna  
Deixar a coluna em repouso por 2- 5 minutos após a adição do Buffer PE, antes de centrifugar.
15. Centrifugar: 13.000 rpm (~17.900 x g) por 1 minuto.
16. Descartar o sobrenadante
17. Centrifugar: 13.000 rpm (~17.900 x g) por 1 minuto
18. Colocar a “Spin column” em um novo tubo de 1,5 mL identificado.
19. Adicionar 30- 50  $\mu$ L de **BUFFER EB** (10mM TRIS-hcl, pH=8,5) (para eluir o DNA) ou 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura-autoclavada ao centro da membrana.  
Deixar a coluna em repouso por 1- 2 minutos
20. Centrifugar: 13.000 rpm (~17.900 x g) por 1 minuto
21. Colocar o filtrado em um tubo limpo de polipropileno, datar e identificar.  
Este material poderá ser estocado a 4°C por até 7 dias, porém é indicado manter congelado a -20°C até o uso.



## Reação de Seqüenciamento

### Preparo do Tampão Save Money pH= 9,0 (estocado a -20°C)

- Cloreto de Magnésio 1M .....	1,0 mL
- Tris – HCl 1M .....	40,0 mL
- H <sub>2</sub> O ultra pura estéril .....	q.s.p 200,0 mL

### Preparo do Mix

**1X**

- Tampão Save Money .....	3,5 µL
- Big Dye .....	0,5 µL
- Oligonucleotídeo Iniciador forward (5 pmol/µL) .....	2,0 µL
	<hr/>
	6,0 µL

### Preparo da Reação

**1X**

- H <sub>2</sub> O ultra pura estéril .....	3,0 µL
- Mix .....	6,0 µL
- Amplímero -amostra (~60-80 ng de DNA) .....	1,0 µL
	<hr/>
	10,0 µL

## Digestão enzimática dos amplicómeros da PCR do genótipo *A. phagocytophilum*

Os produtos amplificados (amplicómeros) que foram submetidos a reação de digestão foram previamente purificados do gel com o QIAquick- Gel purification Purification Kit (Qiagen®). A constatação e visualização dos fragmentos clivados foi realizada em gel de agarose a 1,0% e 2,0% corado com Brometo de Etídeo.

**Ava I:** cliva *A. platys*: 561+ 369 pb e não cliva *A. phagocytophilum*

### Protocolo (em gelo)

- 3 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura estéril
- 14 µL do produto (amplicómero purificado) da reação de PCR
- 1 µL (10U) da enzima de restrição (*Ava* I)
- 2 µL do tampão da enzima (NEB 4)
- Incubar a 37°C durante aproximadamente 1 hora

Fonte: segundo o fabricante (Biolabs™)

### Sítios de reconhecimento:

*Ava* I : 5'... C ↓YCGRG ...3 e 3'...GRGCY ↑C ... 5' Y = c ou t e R= a ou g

Fragmentos: 561+ 369 (*Anaplasma platys*)

**Bpm I:** cliva *A. platys*: ~373+ 557 pb e cliva *A. phagocytophilum* :~372+559pb

### Protocolo

- 2,8 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura estéril
- 14 µL do produto (amplicómero purificado) da reação de PCR
- 1 µL (3U) da enzima de restrição (*Bpm* I)
- 2 µL do tampão da enzima (NEB 3)
- 0,2 µL de BSA (1 X [ ])
- Incubar a 37°C durante aproximadamente 1 hora

Fonte: segundo o fabricante (Biolabs™)

**Sítios de reconhecimento:**

*Bpm I* : 5'... CTGGAG (N)<sub>16</sub>↓... 3' e 3'...GACCTC(N)<sub>14</sub>↑... 5'

Fragmentos: 373 e 557 (*Anaplasma platys*)

Fragmentos: 372 e 559 (*Anaplasma phagocytophilum*)

**Eco NI:** cliva *A. platys*: ~280+ 651 pb e cliva *A. phagocytophilum* :~282+649pb

**Protocolo**

- 3,3 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura estéril
- 14 µL do produto (amplímero purificado) da reação de PCR
- 0,7 µL (10 U) da enzima de restrição (*Eco NI*)
- 2 µL do tampão da enzima (NEB 4)
- Incubar a 37°C durante aproximadamente 1 hora

Fonte: segundo o fabricante (Biolabs™)

**Sítios de reconhecimento:**

*Eco NI* : 5'... CCTNN↓NNNAGG... 3' e 3'...GGANN↑NNTCC... 5'

Fragmentos: 280 e 651 (*Anaplasma platys*)

Fragmentos: 282 e 649 (*Anaplasma phagocytophilum*)

## Digestão enzimática dos amplicómeros da PCR de *Babesia canis*

**Taq I:** cliva *B. canis vogeli*: 26+171+203 pb e não cliva *B. canis canis* e *B. canis rossi*

### Protocolo (em gelo)

- 8 µL do produto (amplicómero purificado) da reação de PCR
- 10 µL (10U) da enzima de restrição (*Taq I*)
- 2 µL do tampão da enzima (React 2)
- Incubar a 65°C durante aproximadamente 3 horas

Fonte: segundo o fabricante (Invitrogen™)

### Sítios de reconhecimento:

*Taq I* : 5'...T ↓CGA ...3 e 3'...AGC ↑ T... 5'

Fragmentos: 26+171+203 (*B. canis vogeli*)

**Hinf I:** cliva *B. canis rossi*: 227+174 pb e não cliva *B. canis canis* e *B. canis vogeli*

### Protocolo (em gelo)

- 7 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura estéril
- 10 µL do produto (amplicómero purificado) da reação de PCR
- 1 µL (10U) da enzima de restrição (*Taq I*)
- 2 µL do tampão da enzima (React 2)
- Incubar a 37°C durante aproximadamente 3 horas

Fonte: segundo o fabricante (Invitrogen™)

### Sítios de reconhecimento:

*Hinf I* : 5'...G ↓ ANTC...3 e 3'...CTNA ↑ G... 5'

Fragmentos: 227+174 (*B. canis rossi*)