UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* E *Anaplasma* EM ROEDORES NO BRASIL

Jyan Lucas Benevenute

Médico Veterinário

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* E *Anaplasma* EM ROEDORES NO BRASIL

Jyan Lucas Benevenute

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária)

2016

Benevenute, Jyan Lucas
O48f OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* E *Anaplasma* EM ROEDORES NO BRASIL/ Jyan Lucas Benevenute. – – Jaboticabal, 2017
x, 66 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Marcos Rogério André
Banca examinadora: Rosangela Zacarias Machado, Darci Moraes Barros Battesti
Bibliografia

1. Análise filogenética. 2. Anaplasmataceae. 3. Brasil. 4. caracterização molecular. 5. PCR em Tempo Real Quantitativa. 6. roedores. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* E *Anaplasma* EM ROEDORES NO BRASIL

AUTOR: JYAN LUCAS BENEVENUTE
ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Marcos R. André

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Rosangela Zacarias Machado

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI
Instituto Butantan / São Paulo,SP

Jaboticabal, 14 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JYAN LUCAS BENEVENUTE, nascido em 26 de outubro de 1991, em Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Filho de Wanda Celia Evangelista e Altair Fortunato Benevenute. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, em janeiro de 2015. Durante o período da graduação foi bolsista de Iniciação Científica PAIC/Fundação Araucária de julho de 2013 a julho de 2014. Ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária), em março de 2015, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Jaboticabal, com bolsa de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

EPÍGRAFE

Do. Or do not. There is no try.”

(Mestre Yoda em: O Imperio Ataca Novamente)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Wanda Celia Evangelisra, Altair Fortunato Benevenute e Ernani Rosas por todo o apoio, amor, conselhos.

Aos meus avós Elza Zielinski Evangelista e José Joaquim Evangelista, Irmã Anally Fortunato Benevenute e demais familiares (primos João Paulo Evangelista, Rafael Evangelista, Sthefany Martini, Luiz Otavio Evangelista, Marcelo Menon e Ramon Evangelista) por todos os momentos partilhados juntos, tristezas e alegrias; o que foi parte fundamental de meu crescimento.

À minha namorada Gabriela Frigo Fernandes por todo o amor, companheirismo, paciência e também pela felicidade que é em tê-la ao meu lado.

Aos professores Marcos Rogério André e Professora Rosângela Zacarias Machado por todo o conhecimento repassado e orientação durante os períodos de estágio curricular e mestrado, além da grande oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Adriano de Oliveira Torres Carrasco e Meire Christina Seki pela orientação, amizade, auxílio em minha carreira e os inúmeros bons conselhos.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório Vanessa Barroco, Gabriela Rivera, Keyla Carstens, Priscila Ikeda, Priscila Preve, Renan Amaral, Marcia Jusi, Rafaela Beraldo, Otavio Junior, Kayo, Luiz Ricardo, Carlos Matos, Paulo Sampaio e demais colegas pela amizade e todo o auxílio.

Ao Dr. André Roque e Dr. Paulo Sérgio D'Andrea e toda a equipe dos laboratórios de Biologia de Tripanosomatídeos e Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz pela conseção das amostras utilizadas no presente estudo e apoio nas extrações de DNA.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa (Processo: 2015/14896-

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	**VIII**
ABSTRACT.....	**IX**
LISTA DE TABELAS.....	**X**
LISTA DE FIGURAS.....	**XI**
1. INTRODUÇÃO.....	**1**
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	**3**
2.1. Infecção por agentes da família Anaplasmataceae.....	**3**
2.1.1.Taxonomia.....	**3**
2.1.2. Agentes etiológicos e principais formas de transmissão.....	**4**
2.1.3. Epizootiologia dos agentes da família Anaplasmataceae em roedores.....	**8**
2.1.4. Epidemiologia dos agentes da família Anaplasmataceae em humanos.....	**14**
3. OBJETIVO GERAL.....	**18**
3.1. Objetivos específicos.....	**18**
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	**19**
4.1. Espécies amostradas e áreas de estudo.....	**19**
4.2. Extração de DNA das amostras de tecido esplênico de roedores.	**21**
4.3. Controle endógeno da PCR.....	**21**
4.4. PCR multiplex em tempo real quantitativa (qPCR) para *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.....	**22**

4.5. Reações de Amplificação para agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseadas no gene *16S rRNA*..... **23**

4.6. Caracterização molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseada nos genes *dsb*, *omp-1*, *groESL* e *msp-4*..... **26**

4.7. Eletroforese de DNA em gel de agarose..... **27**

4.8. Ensaios de PCR em tempo real para *E. canis* (gene *dsb*), *E. chaffeensis* (gene *vlpt*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*)..... **27**

4.9. Reação de sequenciamento..... **28**

4.9.1. Purificação e quantificação dos amplímeros..... **28**

4.9.2 Sequenciamento e construção de árvores filogenéticas..... **28**

5. RESULTADOS..... **30**

5.1. Reação de Amplificação para o gene endógeno IRBP ("Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein")..... **30**

5.2. Detecção molecular de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. pela qPCR multiplex baseada no gene *groESL*..... **31**

5.3. Detecção molecular de *Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp. por ensaios de cPCR..... **35**

5.4. Sequenciamento e análises filogenéticas..... **37**

6. DISCUSSÃO..... **44**

7. CONCLUSÕES **51**

8. REFERÊNCIAS **52**

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 4078/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Detecção e caracterização molecular de agentes anaplasmataceae em roedores selvagens e sinantrópicos no Brasil", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Rogério André está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de abril de 2015.

Jaboticabal, 01 de abril de 2015.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia* E *Anaplasma* EM ROEDORES NO BRASIL

RESUMO – Embora novos genótipos de agentes Anaplasmataceae vêm sendo detectados em carnívoros selvagens, aves selvagens e cervídeos no Brasil, poucos são os estudos acerca da circulação destes patógenos em pequenos mamíferos em nosso território. O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de DNA de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em roedores amostrados no Brasil. Entre 2000 e 2011, diferentes espécies de roedores [n = 60] foram capturadas em cinco biomas brasileiros. As amostras de baço de roedores foram submetidas a extração de DNA utilizando um kit comercial. A presença de DNA de *Ehrlichia* e *Anaplasma* foi investigada utilizando ensaios de PCR em tempo real e convencionais dirigidos a vários genes. Dentre as 458 amostras de baço de roedores testadas, 0,44% (2/458) mostraram-se positivas para *Ehrlichia* spp. e 2,40% (11/458) para *Anaplasma* spp., pelos ensaios de PCR em Tempo Real multiplex baseados no gene *groESL*. A quantificação média do número de cópias de um fragmento do gene *groESL* por microlitro variou de 1,071 x 10^2 a 2,808 x 10^2 cópias para *Ehrlichia* spp. e 1,123 x 10^0 a 1,310 x 10^2 para *Anaplasma* spp. Pelos ensaios de PCR convencional baseados no gene 16S rRNA, 1,09% (5/458) das amostras mostraram-se positivas para *Ehrlichia* sp. e 1,97% (9/458) para *Anaplasma* sp. Análises filogenéticas de máxima verossimilhança baseada em um fragmento de 546 pb do gene 16S rRNA posicionaram os genótipos de *Anaplasma* detectados em roedores próximos a *A. phagocytophilum* ou isolados de *A. marginale* e *A. odocoilei*. Por outro lado, os genótipos de *Ehrlichia* detectados em roedores amostrados mostraram-se intimamente relacionados com *E. canis* com base na análises filogenéticas de um fragmento de 358 pb do gene 16S rRNA. O presente estudo mostrou baixa ocorrência de *Anaplasma* e *Ehrlichia* em roedores no Brasil.

Palavras-Chave: Análise filogenética, Anaplasmataceae, Brasil, caracterização molecular, PCR em Tempo Real Quantitativa, roedores.

OCCURRENCE OF *Ehrlichia* AND *Anaplasma* IN RODENTS IN BRAZIL

ABSTRACT – Although new genotypes of Anaplasmataceae agents have been detected in wild carnivores, wild birds and deer in Brazil, few reports have been done in order to assess the circulation of these pathogens in small mammals in our territory. The present work aimed to investigate the presence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* in rodents sampled in Brazil. Between 2000 and 2011, different rodent species [n=60] were trapped in five Brazilian biomes. Rodents' spleen samples were submitted to DNA extraction using a commercial kit. The presence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* DNA was investigated using real time and conventional PCR assays targeting several genes. Among 458 rodent tested spleen samples, 0.44% (2/458) were positive for *Ehrlichia* spp. and 2.40% (11/458) for *Anaplasma* spp., by a multiplex qPCR assay based on *groESL* gene. The mean quantification of the number of copies of 83pb *groESL* gene fragment per microliter ranged from 1,071 x 10^2 to 2,808 x 10^2 copies for *Ehrlichia* spp., and 1,123 x 10^0 to 1,310 x 10^2 for *Anaplasma* spp. Out of 458 samples tested, 1.09% (5/458) were positive for *Ehrlichia* sp. and 1.97% (9/458) for *Anaplasma* sp. by cPCR assays based on 16S *rRNA* gene. Maximum Likelihood phylogenetic analyse based on 546pb fragment of 16S rRNA gene positioned the *Anaplasma* genotypes detected in rodents near to *A. phagocytophilum* or *A. marginale* and *A. odocoilei* isolates. On the other hand, the *Ehrlichia* genotypes detected in sampled rodents were closely related to *E. canis,* according to the phylogenetic analyses based on 358pb 16S rRNA gene fragment. The present study showed a low occurrence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in rodents in Brazil.

Keywords: Anaplasmataceae, Brazil, molecular characterization, Phylogenetic analysis, quantitative Real Time PCR, rodents.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, sondas de hidrólise e condições térmicas de ciclagem utilizadas nos ensaios de qPCR Multiplex para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., baseada no gene *groESL*..... **23**

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, tamanhos dos amplímeros e condições térmicas utilizados nos ensaios de cPCR para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp..... **25**

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, tamanhos dos amplímeros e condições térmicas de ciclagem utilizadas na caracterização molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. pelos ensaios de cPCR baseadas nos genes *dsb*, *groESL*, *msp-4* e *omp-1*..... **26**

Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, sondas de hidrólise e condições térmicas de ciclagem utilizadas nos ensaios de qPCR específicos para *E. canis, E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*..... **28**

Tabela 5. Resultados da detecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em roedores pela qPCR multiplex baseada no gene *groESL*…….... **32**

Tabela 6. Parâmetros dos ensaios de qPCR multiplex baseada no gene *groESL* para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em roedores…… **34**

Tabela 7. Ocorrência de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. entre os roedores capturados nos diferentes biomas brasileiros..... **37**

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Distribuição dos roedores capturados (n=468) em cinco biomas brasileiros..... **20**

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo referente à amplificação do gene endógeno IRBP. M= marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®), 1-26 amostras positivas, C+: Controle positivo (amostra de DNA de roedor sabidamente positiva); C-: controle negativo (água esterilizada ultra-pura)..... **31**

Figura 3. Curvas de amplificação (A) e padrão (B) referentes à qPCR multiplex para Ehrlichia spp.e Anaplasma spp. baseada no gene groESL de amostras em duplicata que mostraram diferença de Cq menor que 0,5. Em A, enquanto as curvas em preto representam a amplificação de plasmídeos (100 a 107) contendo um fragmento de 75pb do gene groESLde Anaplasma sp. (Cy5), as curvas em azul representam amplificação de plasmídeo (100 a 107) contendo um fragmento de 94pb do gene groESL de Ehrlichia sp. (TET). As curvas ou linhas em vermelho representam a amplificação de amostras de DNA de tecidos de roedores..... **33**

Figura 4. Distribuição dos roedores capturados (n=468) em cinco biomas brasileiros e amostras positivas para *Ehrlichia* e *Anaplasma* nos ensaios de cPCR, baseado no gene 16S *rRNA* e qPCE baseada no gene *groESL*.... **36**

Figura 5. Posição filogenética de sequências de *Anaplasma* spp. utilizando o método de Máxima Verossimilhança e modelo GTR+I+R. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado **41**

das sequências.....

Figura 6. Posição filogenética de sequências de *Ehrlichia* spp. utilizando o método de Máxima Verossimilhança e modelo TIM2+R2+F. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências..... **43**

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm sido desenvolvidos objetivando uma maior compreensão dos fatores relacionados à ocorrência de enfermidades transmitidas por artrópodes. Neste sentido, a interação entre carrapatos vetores com hospedeiros mamíferos desempenha papel fundamental na dinâmica que mantêm tais agentes no ambiente (RIZZOLI et al., 2014). Neste âmbito, a avaliação do papel de roedores nos ciclos de transmissão das bactérias da família Anaplasmataceae tem contribuído para a determinação de aspectos relevantes na epidemiologia das doenças causadas por esses agentes em diversas regiões do mundo.

No Brasil, os primeiros casos suspeitos de erliquiose humana, possivelmente associados à *Ehrlichia chaffeensis*, foram observados por Calic et al. (2004) em duas pessoas no estado de Minas Gerais. Os pacientes em questão apresentaram sinais clínicos (febre, mialgia, vômitos, náusea e dores de cabeça) e laboratoriais (leucopenia, trombocitopenia, alterações dos valores de transaminases hepáticas e bilirrubina) sugestivos da enfermidade, além de mostraram-se sorologicamente positivos para *E. chaffeensis* pela Reação de Imunofluorescência Indireta.

Em áreas rurais no estado de Minas Gerais, Costa et al. (2005; 2006) relataram soroprevalência de 10,5% (46/437) para *E. chaffeensis* em uma população humana aparentemente saudável; adicionalmente, anticorpos anti-*E. chaffeensis* foram detectados em sete pacientes com sinais clínicos sugestivos e fatores epidemiológicos predisponentes (contato com animais e carrapatos) para erliquiose, com destaque para ocorrência de febre com duração média de 6 dias. Tais trabalhos

demonstram a possível exposição de seres humanos no Brasil a agentes Anaplasmataceae, embora não possa ser descartada a ocorrência de reação sorológica cruzada entre *Anaplasma phagocytophilum* e *E. chaffeensis* e entre *E. chaffeensis* e *Bartonella quintana* (COSTA et al., 2005).

Recentemente, Vieira et al. (2013) demonstraram soroprevalência de 5% (5/100) tanto para *Ehrlichia canis* como *E. chaffeensis*, por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta, com títulos variando de 64 a 512 e 64 a 256, respectivamente,em seres humanos amostrados em áreas rurais no estado do Paraná.

Embora roedores sejam incriminados como reservatórios de *A. phagocytophilum* nos Estados Unidos (FOLEY et al., 2002) e Europa (OBIEGALA et al., 2014), poucos são os estudos conduzidos a respeito da ocorrência de agentes Anaplasmataceae em pequenos mamíferos de vida livre no Brasil. Em estudo realizado por Wolf et al. (2016), no qual houve a investigação da ocorrência de *Ehrlichia* e *Anaplasma* spp. em pequenos mamíferos capturados no Pantanal do Mato Grosso, no qual detectou-se a presença de um genótipo 99% similar a *Anaplasma* spp. em uma das amostras (0,01%) de roedor da espécie *Hylaeamys megacephalus*.

Aindam em nosso país, novos genótipos de agentes Anaplasmataceae vêm sendo detectados em carnívoros, aves e cervídeos selvagens (MACHADO et al., 2012; SACCHI et al., 2012, ANDRÉ et al., 2010; 2012; SILVEIRA et al., 2012; 2015). Desta forma, o presente trabalho objetiva investigar a ocorrência de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em roedores de vida livre em diversas regiões do Brasil. O

sequenciamento das amostras positivas a partir de tecidos de roedores permitirá situá-las em um contexto de parentesco evolutivo com sequências previamente depositadas no *GenBank*. No futuro, o presente trabalho poderá contribuir para a delimitação de áreas nas quais ocorra a possibilidade de transmissão destes patógenos para animais domésticos e seres humanos, auxiliando na elaboração de medidas de controle eficientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecção por agentes da família Anaplasmataceae

2.1.1. Taxonomia

A família Anaplasmataceae, pertencente à ordem Rickettsiales*,* é composta por alfa-proteobactérias gram-negativas, compreendendo os gêneros *Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia* e *Wolbachia* (DUMLER et al., 2001).

Parasitas intracelulares obrigatórios, as bactérias pertencentes aos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* replicam-se em vacúolos intracitoplasmáticos de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eritrócitos (DUMLER et al., 2001; RAR et al., 2011), formando microcolônias chamadas de mórulas e causando infecções em humanos e várias espécies de animais domésticos e selvagens. Grande parte das erliquioses e anaplasmoses descritas em humanos são zoonoses transmitidas por carrapatos (DOUDIER et al., 2010; ISMAIL et al., 2010; WOLDEHIWET, 2010).

Desta forma, tais enfermidades representam um risco crescente à saúde pública e animal, principalmente devido às mudanças ecológicas e climáticas que

ocorrem no planeta. Visto que a dinâmica que mantêm essas bactérias no ambiente é determinada principalmente pela interação entre carrapatos vetores com hospedeiros mamíferos, a mesma pode ser influenciada por fatores climáticos como temperatura, precipitação e umidade relativa (HARRUS e BANETH, 2005; RIZZOLI et al., 2014).

2.1.2. Agentes etiológicos e principais formas de transmissão

A. phagocytophilum é o agente causador da Anaplasmose Granulocítica Humana, Febre dos Carrapatos em Ruminantes, Anaplasmose Granulocítica Equina e Anaplasmose Granulocítica dos cães e gatos (WOLDEHIWET et al., 2010; RAR et al., 2011). Carrapatos pertencentes ao gênero *Ixodes* atuam como vetores competentes desta bactéria, a qual pode sobreviver ao processo de muda e infectar um novo hospedeiro durante a próxima alimentação destes artrópodes, embora a transmissão transovariana não ocorra (RIZZOLI et al., 2014; BACKKEN e DUMLER, 2000). Os carrapatos do complexo *Ixodes persulcatus* estão associados à transmissão do agente no Hemisfério Norte (RIZZOLI et al., 2014; WOLDEHIWET et al., 2010). Na Europa, os carrapatos *Ixodes ricinus* e *Ixodes trianguliceps* são considerados os principais vetores do *A. phagocytophilum* (DOUDIER et al., 2010; BLANAROVÁ et al., 2014). Ainda, Paulauskas et al. (2012) detectaram DNA de *A. phagocytophilum* em *Dermacentor reticulatus* na Lituânia. Já nos Estados Unidos, a espécie *Ixodes scapularis* atua como vetor competente nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte; na região oeste, *Ixodes pacificus* apresenta maior competência vetorial, quando comparado a outras espécies de carrapatos (RAR et

al., 2011; RUSSART et al., 2014). Quando infectados, animais e humanos podem apresentar desde infecção assintomática a doença fatal. O que pode variar dependendo de fatores relacionados ao hospedeiro, e isolado do agente em questão. A febre é o sinal clínico mais comumente observado. Achados laboratoriais como anemia, trombocitopenia e leucopenia, que ocorrem devido à multiplicação bacteriana, são parâmetros importantes no diagnóstico (ISMAIL et al., 2010; WOLDEHIWET et al., 2010). No Brasil, *Anaplasma* spp. filogeneticamente relacionado ao *A. phagocytophilum* foi detectado em carnívoros selvagens (ANDRÉ et al., 2012), aves selvagens (MACHADO et al., 2012) e gatos domésticos (ANDRÉ et al., 2014). O agente também foi detectado, por meio da PCR em tempo real, em cães e carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato e *Amblyomma sculptum* (citado como *A. cajennense*) no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2013) e, por meio da PCR convencional, em veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) e em um cão no estado de Minas Gerais (SILVEIRA et al., 2012; 2015).

Também pertencente à família Anaplasmataceae, *E. chaffeensis* é o agente zoonótico causador da Erliquiose Monocítica Humana, que ocorre principalmente em pacientes com histórico de imunodeficiência (RAR et al., 2011). O agente em questão está associado também a infecções em outras espécies de mamíferos domésticos e selvagens em território norte-americano, incluindo cães, bovinos, cabras, raposas e coiotes (DE LOS SANTOS et al., 2007; DOUDIER et al., 2010). No Brasil, um agente filogeneticamente próximo à *E. chaffeensis* foi detectado em cervos-do-pantanal e aves carnívoras, por meio de técnicas moleculares e sorológicas (SACCHI et al., 2012; MACHADO et al., 2012). Nos Estados Unidos, carrapatos da espécie

Amblyomma americanum e veados da espécie *Odocoileus virginianus* (veado-de-cauda-branca) são considerados os principais vetores e reservatórios da *E. chaffeensis*, respectivamente (RAR et al., 2011). Carrapatos das espécies *Dermacentor variabilis* e *I. pacificus* também podem ser infectados com *E. chaffeensis*, possivelmente atuando como vetores em outras regiões (WALKER et al., 2004). Os sinais clínicos mais comumente observados na infecção por *E. chaffeensis* em humanos são febre, dores de cabeça, mialgia e náuseas, os quais ocorrem normalmente nove dias pós-infecção, variando desde uma doença febril leve à enfermidade severa (RAR et al., 2011). Devido à inexistência de sinais clínicos específicos, os achados laboratoriais tornam-se importantes no diagnóstico, destacando-se leucopenia, neutrofilia, trombocitopenia e elevação dos níveis de transaminases hepáticas (WALKER et al., 2004; DOUDIER et al., 2010; ISMAIL et al., 2010).

O agente causador da Erliquiose Monocítica Canina, *E. canis,* tem como hospedeiros principais cães domésticos e canídeos selvagens, sendo transmitido por carrapatos das espécies *Rhipicephalus* sp. e *D. variabilis* (LITTLE, 2010; RAR et al., 2011). Trabalhos recentes propõem que o táxon *R. sanguineus* sensu lato é possivelmente composto por pelo menos duas cepas, morfológica e geneticamente distintas na região Neotropical. Além do tamanho dos carrapatos, que tende a ser menor em regiões próximas ao Equador em relação aos carrapatos encontrados em latitudes superiores, existem diferenças na competência vetorial para *E. canis* entre estas linhagens, na qual apenas a linhagem tropical apresentou-se como vetor competente de *E. canis* (MORAES-FILHO et al. 2015; SANCHES et al., 2015).

O carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius) pertence a um complexo de espécies que atualmente compreende seis taxons (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014). No Brasil, *A. cajennense* s.s. Ocorre na região amazônica até o estado de Mato Grosso (em parte), enquanto *Amblyomma sculptum* Berlese, o vetor real de *Rickettsia rickettsii*, ocorre no resto do Brasil, no norte da Argentina, Bolívia e Paraguai (MARTINS et al., 2016).

Novos genótipos de *Ehrlichia* spp. filogeneticamente próximos à *E. canis* e *E. chaffeensis,* foram detectados em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil (ANDRÉ et al., 2010; 2012). Na Venezuela, dentre uma amostra de pacientes humanos com sinais clínicos sugestívos de erliquiose (febre com 2 a 6 dias de duração, erupções cutãneas, dores de cabeça, mialgia, trombocitopenia e leucopenia), 30% (6/20) mostraram-se positivos para *E.* canis por meio da PCR baseada no gene 16S rRNA (PEREZ et al., 2006). Recentemente, foi relatada a presença de DNA de *E. canis* e anticorpos específicos contra este agente em amostras de sangue provenientes de doadores na Costa Rica. Das 280 amostras de humanos analisadas, 10 (3,6%) mostraram-se positivas aos ensaios de PCR baseados no gene *dsb* (BOUZA-MORA et al., 2016).

Ehrlichia ewingii, por sua vez, apresenta como principais vetores carrapatos da espécie *A. americanum* (responsável pela manutenção do agente nos Estados Unidos) e está associada à erliquiose granulocítica em cães e humanos. Diferentemente das outras espécies pertencentes a esse gênero, *E. ewingii* infecta granulócitos, embora os sinais clínicos observados sejam semelhantes àqueles apresentados em outras erliquioses (RAR et al., 2011). Ainda, DNA deste agente foi

detectado em carrapatos da espécie *R. sanguineus* sensu lato em Oklahoma, nos Estados Unidos, e em Camarões (MURPHY et al., 1998; NDIP et al., 2007).

Anaplasma platys, causador da trombocitopenia cíclica infecciosa canina, parasita principalmente trombócitos de cães. Este agente apresenta como possíveis vetores os carrapatos das espécies *R. sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* e *Rhipicephalus evertsi* (DUMLER et al., 2001; SILAGHI et al., 2017). No Brasil, o referido agente vem sendo detectado em cães de diversas regiões (DAGNONE et al., 2009; COSTA-JÚNIOR et al., 2013; da SILVA et al., 2016; MELO et al., 2016). Adicionalmente, um genótipo filogeneticamente relacionado a *A. platys* foi detectado em cervídeos da espécie *Blastocerus dichotomus* (SACCHI et al., 2012).

2.1.3. Epizootiologia dos agentes da família Anaplasmataceae em roedores

Identificar tendências temporais na prevalência de doenças infecciosas e seus vetores é um passo importante parauma melhor compreensãoe gestão de surtos de doenças no futuro (REJMANEK et al., 2011). Desta forma, estudos recentes têm demonstrado a importância de pequenos mamíferos no ciclo epidemiológico dos patógenos transmitidos por carrapatos (SZEKERES et al., 2014). Estudos prévios demonstram a importância dos roedores selvagens na manutenção de agentes Anaplasmataceae na natureza, atuando como reservatórios para os patógenos em questão e como hospedeiros para os estágios imaturos de carrapatos vetores, o que consequentemente oferece riscos à saúde humana e animal (FOLEY et al., 2002; OBIEGALA et al., 2014).

Nicholson et al. (1999), ao amostrarem roedores da espécie *Neotoma fuscipes* no norte da Califórnia, Estados Unidos, encontraram soroprevalência de 68% (25/74) frente a *A. phagocytophilum*. Das amostras soropositivas, 68% (17/25) mostraram-se também positivas à PCR convencional baseada no gene *groESL* para o agente em questão. Ainda, 10% (5/51) dos roedores da espécie *Peromyscus truei* amostrados mostraram-se sorologicamente positivas, sendo que apenas uma dessas também se mostrou positiva à PCR para *A. phagocytophilum*. Por outro lado, nenhuma das cinco (9%) amostras soropositivas de *Peromyscus maniculatus* mostraram-se positivas na PCR para o agente supracitado. Segundo Nicholson et al. (1999), tais resultados sugerem a possibilidade de alta incidência de infecção por *A. phagocytophilum* ou período prolongado de bacteremia neste grupo de animais.

Utilizando a técnica de PCR convencional baseada no gene *msp-2*, Foley et al. (2008a) detectaram *A. phagocytophilum* em 3,8% (33/652) das amostras de sangue total colhidas de roedores de 12 espécies nas regiões central e norte da Califórnia. Já em outro estudo, uma soroprevalência de 14,5% (47/325) frente ao antígeno de *A. phagocytophilum* foi encontrada dentre uma amostra de diferentes espécies de roedores (*Tamias senex, Glaucomys sabrinus, N. fuscipes, Tamiasciurus douglasii, Sciurus griseus* e *Summary beecheyi)*, espacialmenteagrupados a oeste do rio Trinity em um raio de 362,8metros no estado Califórnia (FOLEY et al., 2008b).

Em território Sul Coreano, Chae et al. (2008) detectaram, por meio da PCR convencional baseada no gene 16S *rRNA*, a presença de *A. phagocytophilum* em 1,1% (7/570) dos carrapatos da espécie *Haemaphysalis longicornis* e em 1,4% (10/742) de *Ixodes nipponensis*, coletados da vegetação e também de roedores

selvagens da espécie *Apodemus agrarius*. A prevalência de *E. chaffeensis* nestas duas espécies de carrapatos foi de 9,6% (55/570) e 0,3% (2/742), respectivamente. Ainda, a prevalência de *E. chaffeensis* em carrapatos da espécie *Haemaphysalis flava* foi de 2% (6/306), enquanto que nenhuma amostra mostrou-se positiva para *A. phagocytophilum*. Porcentagens de positividade de 5,6% (20/358) e 35,2% (126/358) para *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis,* respectivamente, foram encontradas em amostras de baço coletadas de roedores da espécie *A. agrarius* pela técnica de nested-PCR.

Por meio de infecção experimental, Nieto e Foley (2009) observaram que esquilos da espécie *T. ochrogenys* mostraram-se como potenciais reservatórios para *A. phagocytophilum*. Além disso, mostram certas características demográficas que contribuem para a transmissão do agente, tais como alta densidade populacional, longa vida útil em relação a outras espécies de roedores e a capacidade de infectar-se por longos períodos de tempo. Além disso, a movimentação destes animais poderia resultar em disseminação dos carrapatos para outras espécies de reservatórios vertebrados, o que facilitaria a propagação das infecções por este agente.

Na região norte da Califórnia, em estudo realizado para avaliação do papel de pequenos roedores na manutenção de *A. phagocytophilum* em ambiente silvestre, foi observado soropositividade de 21,4% (35/158). Já pela PCR em tempo real baseada no gene *msp-2*, observou-se positividade em 10.6% (15/141) dos roedores da espécie *Tamias ochrogenys*. Dos carrapatos das espécies *I. pacificus* (126), *Ixodes angustus* (24), *Ixodes ochotonae* (2) e *Ixodes spinipalpis* (2) coletados desses

roedores, apenas um espécime de *I. pacificus* mostrou-se positivo à PCR em tempo real para *A. phagocytophilum* (FOLEY e NIETO, 2011).

Foley et al. (2011), em estudo realizado no estado da Califórnia, observaram que de um total de 628 carrapatos testados para *A. phagocytophilum*pela PCR em tempo real, oito espécimes de *I. pacificus* e 2 adultos de *I. ochotonae* mostraram-se positivos. Tais carrapatos foram coletados do ambiente e também de roedores das espécies *N. fuscipes* e *T. ochrogenys*, sendo que 11,8% (4/42) e 8,9% (6,81) destes animais mostraram-se positivos para *A. phagocytophilum* pela PCR em tempo real.

Rejmanek et al. (2012), ao infectarem experimentalmente roedores da espécie *N. fuscipes* com as estirpes DU-1 e HZ de *A. phagocytophilum*, verificaram que os parasitas podem se manter detectáveis em amostras de sangue pela PCR em tempo real por pelo menos oito meses, confirmando seu papel como reservatórios competentes para o referido patógeno zoonótico, como proposto anteriormente por Nicholson et al. (1999). Ainda, roedores da espécie *N. fuscipes* são suscetíveis à infecção por três isolados de *A. phagocytophilum* (HZ, MRK e Dog_CA), responsáveis por causar doença clínica em cavalos e cães (NIETO et al., 2010).

Na região central da Finlândia, Kallio et al. (2014), por meio da PCR convencional baseada no gene 16S rRNA, encontraram ocorrência de 21,9% (33/151) frente ao *A. phagocytophilum* em ratazanas da espécie *Myodes glareolus*.
Já na região sul da Alemanha, Obiegala et al. (2014) observaram, por meio da PCR em tempo real baseada no gene *msp-2*, positividade de 1,1% (7/631) para *A. phagocytophilum* em amostras de baço e sangue de pequenos roedores das espécies *Apodemus sylvaticus*, *M. glareolus e Apodemus flavicollis*; ainda,1,7%

(16/965) dos carrapatos da espécie *I. ricinus* (ninfas e larvas) colhidos destes animais também mostraram-se positivos para o agente em questão. Tal fato indica a possibilidade de que estas espécies de roedores possam atuar como hospedeiros acidentais ou reservatórios do patógeno em questão.

Blanarová et al. (2014) detectaram, por meio da PCR em tempo real baseada no gene *msp-2*, *A. phagocytophilum* em 1,6% (11/669) das amostras de cortes de orelha e 2,2% (9/407) das amostras de baço de roedores das espécies *A. agrarius, A. flavicollis e M. glareolus* capturados na região central da Europa. Os autores supracitados sugerem que *I. trianguliceps* possivelmente demonstre maior competência vetorial para o referido agente quando comparado ao *I. ricinus*, visto que em áreas onde não foi observada a presença de *I. trianguliceps*, também não foi detectada a presença do *A. phagocytophilum* nas amostras de orelha e baço dos roedores.

Szekeres et al. (2014), ao capturarem 525 roedores no sul da Hungria, coletaram amostras de pele e baço para pesquisa de DNA de *A. phagocytophilum*. O referido patógeno foi detectado em 23 (4,38%) e 9 (1,71%) amostras de pele e baço dos roedores, respectivamente, pela qPCR baseada no gene *groESL*.

Blaˇnarová et al. (2014), por sua vez, detectaram a presença de DNA de *A. phagocytophilum* em roedores e carrapatos de duas regiões na Eslováquia. Das 407 amostras de baço de roedores testadas, 9 (2,21%) mostraram-se positivas na qPCR para o referido patógeno baseada no gene *msp-2.* Adicionalmente, dos 1376 carrapatos da espécie *I. ricinus* coletados de quatro áreas de amostragem, apenas 10 (0,7%) mostraram-se positivos na qPCR para *A. phagocytophilum*.

Moustafa et al. (2015), ao coletaram 252 amostras de sangue de roedores em Hokkaido, no Japão, verificaram que seis (2,4%; 6/252) mostraram-se positivas para *Anaplasma* spp. nos ensaios de PCR baseados nos genes *gltA* e 16S rRNA.

No sudoeste da Eslováquia, Svitálková et al. (2015), avaliaram a presença de *A. phagocytophilum* em 606 amostras de baço e pele de roedores capturados em seis áreas urbanas e suburbanas e em habitats naturais. Apenas uma (0,2%) amostra de baço e três (0,5%) amostras de pele de roedores mostraram-se positivas nos ensaios de qPCR para *A. phagocytophilum*, baseada no gene *msp2*. Adicionalmente, 7984 carrapatos (ninfas e adultos) foram coletados durante o estudo, em diferentes transectos, dos quais 4374 pertenciam à espécie *I. ricinus.* Pela qPCR, também baseada no gene *msp2*, 224 (5,1%) espécimes de carrapatos da espécie *I. ricinus* mostraram-se positivos para *A. phagocytophilum*. Segundo os autores, embora *A. phagocytophilum* tenha sido detectado em carrapatos *I. ricinus* colhidos nos diferentes transectos no sudoeste da Eslováquia, principalmente em áreas urbanas, roedores parecem não atuarem como os principais reservatórios da bactéria na área investigada.

Chastagner et al. (2016) avaliaram a ocorrência de *A. phagocytophilum* em 1163 amostras de sangue de roedores das espécies *A. sylvaticus, A. flavicollis* e *M. glareolus*, no leste e oeste da França. Os roedores foram capturados, marcados e recapturados, durante a primavera e o outono. Amostras de sangue de 75 (22,8%) roedores da região leste mostraram-se positivas na qPCR para *A. phagocytophilum* baseada no gene *msp2*; destas, 13 mostraram-se negativas na primeira captura. Dez indivíduos mostraram-se negativos na captura do mês seguinte, e apenas três

mostraram-se positivos nas duas estações de captura. Na região oeste, a prevalência do patógeno foi menor (6,6%) quando comparada àquela verificada entre roedores amostrados na região leste, e significativamente maior no outono do que na primavera.

Wolf et al. (2016) investigaram a ocorrência de *Ehrlichia* e *Anaplasma* spp. em pequenos mamíferos capturados no Pantanal do Mato Grosso, centro-oeste do Brasil. Amostras de sangue e baço foram colhidas de 42 roedores. Nos ensaios de PCR baseados no gene 16S rRNA, Devido à alta conservação deste gene entre as espécies de *Anaplasma* spp., não foi possível inferir à qual espécie a amostra era filogeneticamente relacionada.

2.1.4. Epidemiologia dos agentes da família Anaplasmataceae em humanos

Na América do Sul, Perez et al. (2006) detectaram, isolaram e caracterizaram molecularmente, pela primeira vez, *E. canis* em seres humanos. Para tal, foram colhidas amostras de soro de 43 adultos aparentemente saudáveis, os quais conviviam com cães que apresentavam sinais clínicos compatíveis com erliquiose canina causada por *E. canis.* Seis cães mostraram-se soropositivos para *E. canis* pela RIFI. Das 43 amostras de soro dos adultos, 2 amostras de soro de mulheres assintomáticas mostraram-se positivas para *E. chaffeensis, Ehrlichia muris*, e *E. canis* pela RIFI. O soro da primeira paciente, de 27 anos, apresentava título mais elevado contra o antígeno de *E. chaffeensis* (160), enquanto o soro da paciente de 18 anos apresentava títulos mais elevados contra todos os antígenos do que a primeira paciente, sendo que o maior título foi para *E. muris* (1:10000). Após PCR

baseada no gene 16S rRNA seguida de sequenciamento na amostra de sangue da paciente 1, a espécie de *Ehrlichia* detectada diferiu de *E. canis* em duas bases apenas, demonstrando uma identidade de 99,9%, indicando que o patógeno encontrado provavelmente fosse uma nova subespécie ou amostra de *E. canis* capaz de infectar os seres humanos.

Heo et al. (2002) investigaram a presença de anticorpos para *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis* pela Reação de Imunoflorescência Indireta (RIFI) e Western blot, e DNA dos agentes sob estudo pela PCR em tempo real baseada no gene 16S rRNA, em amostras de soro de 491 pacientes coreanos que apresentavam doenças febris agudas. Pela RIFI, 1,8%, e de 0,4% dos pacientes mostraram-se soropositivos para *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis*, respectivamente. No ensaio de qPCR baseada no gene 16S rRNA, uma única amostra mostrou-se positiva para *A. phagocytophilum* (0,2%), porém, a mesma apresentou-se negativa pelo Western blot.

Calic et al. (2004), detectaram, pela RIFI, a presença de anticorpos anti-*E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum* em dois pacientes no estado de Minas Gerais, Brasil. Embora ambos os pacientes apresentassem sintomas semelhantes e sugestivos de "Febre Maculosa" (febre, dores de cabeça, vômito, mialgias, conjutivites, insuficiência renal e respiratória), o paciente de Monte Carmelo mostrou-se sorologicamente negativo para *R. rickettsii* e soropositivo para *E. chaffeensis.* O segundo paciente, residente na cidade de Ponta Nova, também em MG, além de apresentar os mesmos sintomas do primeiro paciente, apresentou ainda icterícia, insuficiência respiratória e renal, diarréia, hepatomegalia, desnutrição e confusão

mental. Embora sorologicamente negativo para o agente da febre maculosa, o segundo paciente mostrou-se soropositivo para *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum*.

Dumler (2005) avaliou os pontos relevantes da infeccção de humanos por *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. Dentre os agentes presentes na família Anaplasmataceae, sabe-se que pelo menos cinco são capazes de infectarem seres humanos, sendo eles: *E. chaffeensis, E. ewingii, E. canis, A. phagocytophilum* e *Neorickettia sennetsu.* A espécie *E. chaffeensis* infecta monócitos do sangue, sendo responsável pela enfermidade denominada “erliquiose monocítica humana” (HME). Ocorre ainda reação sorológica cruzada entre esse patógeno com *E. ewingii,* embora o último agente infecte neutrófilos. Em contraste, a “anaplasmose granulocítica humana” (HGA), é causada pela bactéria *A. phagocytophilum.* Apesar de causadas por diferentes patógenos, essas doenças compartilham algumas manifestações clínicas e laboratoriais, como febre e trombocitopenia, por exemplo.

Weil et al. (2012) investigaram a presença de DNA de *A. phagocytophilum* em amostras de sangue de 692 pacientes de um hospital suburbano de Boston, Massachusetts, Estados Unidos. Os pacientes positivos para o patógeno em questão apresentavam sintomas compatíveis com HGE: febre foi relatada em 85% dos casos positivos, assim como mialgias (73%) e dores de cabeça (42%). Das 692 amostras, 33 (4,8%) mostraram-se positivas para *A. phagocytophilum* pela PCR baseada no gene *groESL*, mais especificamente na região de leitura aberta *HSPD1*, que detecta e diferencia *A. phagocytophilum* de outros patógenos transmitidos por carrapatos, como *E. ewingii e E. chaffeensis*.

Welc-Falęciak et al. (2015) investigaram a presença de DNA de *A. phagocytophilum* em 28 pacientes hospitalizados com diagnóstico precoce para doença de Lyme na província de Podlaskie, leste da Polônia, por meio de ensaios de PCR convencional baseados nos genes *groESL e 16S rRNA*. Das 28 amostras de sangue testadas, DNA de *A. phagocytophilum* foi detectado em uma única amostra (3,6%). O paciente positivo para anaplasmose relatou mal-estar, fraqueza, e dores musculares no corpo, que se iniciaram dez dias após a remoção do carrapato de sua perna.

Wissmann et al. (2015), por sua vez, avaliaram o risco de infecção por *A. phagocytophilum* após picadas de carrapatos na região da Bavaria, na Alemanha. Neste trabalho foram colhidas amostras de sangue em intervalos de duas semanas, em pacientes que haviam relatado exposição prévia a carrapatos. Enquanto apenas um (0,9%[1/107]) indivíduo mostrou-se soropositivo para os testes com IgM, oito (7,5%) mostraram presença de anticorpos IgG para o referido agente. Em contraste, nenhuma das amostras de sangue mostrou-se positiva para o referido agente nos ensaios de PCR baseados no gene *16S rRNA*. Tendo em vista que o único paciente soropositivo mostrou-se assintomático, os autores sugerem que a amostra de *A. phagocytophilum* presente nos carrapatos da Bavaria apresenta baixos risco e patogenicidade aos humanos.

Recentemente, em trabalho realizado por Bouza-Mora et al. (2016), utilizaram 280 amostras de sangue de doadores armazenadas em bancos de sangue, colhidas durante 2007, na Costa Rica. Além disso, 100 amostras de soro foram seleccionadas aleatoriamente a partir da mesma população de doadores, as quais foram testadas

por RIFI para a presença de anticorpos reactivos a *E. canis*. Foram detectados anticorpos anti-*E. canis* em 35 (35%) destas amostras de soro (35/100), sendo que 30 (30%) apresentaram baixa titulação (64 a 256) e cinco (5%) mostraram elevada titulação de anticorpos (1024 a 8192) pela RIFI. Aos ensaios s de PCR baseado no gene *dsb*, foi detecato DNA de *E. canis* em 2,8% (10/280) das amostras de sangue testadas. As cinco amostras que apresentaram elevada titulação pela RIFI mostraram-se positivas também na PCR.

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo pesquisar, por meio de métodos moleculares, a presença de DNA de bactérias da família *Anaplasmataceae* (*E. canis, E. chaffeensis, E. ewingii, A. platys e A. phagocytophilum)* em amostra de baço de roedores no Brasil.

3.1. Objetivos específicos

- Investigar a presença e quantificar DNA de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em amostras de baço de roedores amostrados em diversas localidades no Brasil;
- Posicionar filogeneticamente as sequências de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. obtidas a partir de fragmentos esplênicos de roedores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécies amostradas e áreas de estudo

No período de 1999 e 2013, roedores foram capturados utilizando armadilhas do tipo "*live-traps"* (modelos Tomahawk e Shermann), dispostas em transectos com estações de captura distribuídas a cada 10 metros, durante diferentes expedições científicas realizadas em diversas regiões do Brasil pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LabTrip, IOC-FIOCRUZ) e demais colaboradores (em especial o Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – LBPMSR também do IOC). A eutanásia dos animais capturados foi realizada quando da necessidade de identificação taxonômica e/ou diagnóstico de parasitas. Para este procedimento, foi utilizada associação de Cetamina (100 mg/Kg) + acepromazina (10 mg/Kg), por via intramuscular, seguida por aplicação de Cloreto de Potássio (19,1%) (2ml/Kg), por via intracardíaca. Após eutanásia dos animais, fragmentos de baço foram então colhidos e acondicionados em microtubos livres de DNAse e RNAse, adicionando-se etanol absoluto para preservação do material. Tais amostras foram organizadas como uma coleção de fragmentos de baços – BAÇOTECA, a qual foi catalogada por número de registro, espécie de mamífero, data e localidade. Posteriormente, essas amostras foram armazenadas a -20º C no LabTrip.

A identificação taxonômica dos roedores amostrados foi baseada inicialmente na morfologia externa e confirmada por análise cariotípica por técnicas citogenéticas e, quando necessário, pela análise da morfologia craniana (BONVICINO et al.,2008). A identificação dos roedores foi realizada pela equipe de mastozoólogos do LBPMSR

(IOC-Fiocruz). Dentre um total de mais de 3300 fragmentos de tecidos armazenados na coleção, foram selecionados de modo aleatório 468 amostras, as quais foram colhidas em 5 biomas brasileiros conforme demonstrado na **Figura 1**. Todas as colheitas foram realizadas seguindo autorização do IBAMA e aprovadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da FIOCRUZ (P0007-99; P0179-03; P0292/06; L0015-07).

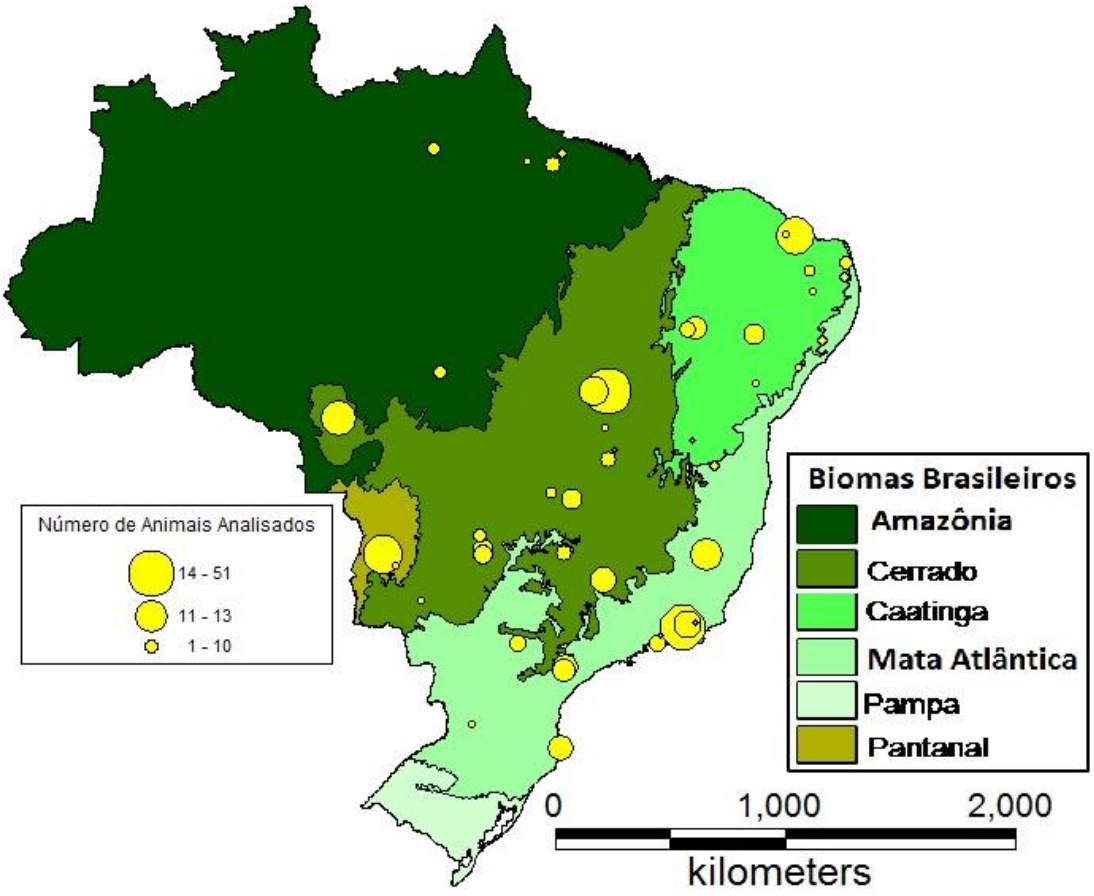


Figura 1. Distribuição dos roedores capturados (n=468) em cinco biomas brasileiros.

O georreferenciamento dos locais de captura dos roedores amostrados no presente estudo foi realizado através do software *MapInfo* 6.5.

4.2. Extração de DNA das amostras de tecido esplênico de roedores

A extração de DNA de tecido esplênico de roedores (10 mg) foi realizada com o DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de DNA extraídas foram identificadas e armazenadas a -20°C para realização da qPCR. Tais amostras tiveram a concentração de ácidos nucleicos e relações 260/280 e 260/230 mensuradas pelo Nanodrop (Thermo Scientific).

4.3. Controle endógeno da PCR

Com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos, em virtude da presença de inibidores, as amostras de DNA foram submetidas a um ensaio de PCR convencional objetivando a amplificação do gene IRBP de mamíferos (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”) para o controle endógeno da reação. A reação de cPCR foi realizada utilizando-se 3 µL de DNA alvo, tampão da PCR (PCR Buffer 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1,0mM Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 0,6mM deoxinucleotídeos (dNTPs), 1,5U Taq DNA Polymerase (Life Technologies®), 1,25µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich®), e 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador: IRBPfwd: 5’-TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC-3’ e IRBPrev: 5’-GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC-3’, os quais flanqueiam uma região de 22 pb do gene supracitado.

As condições da PCR para amplificação do gene IRBP foram de: desnaturação inicial de 94ºC por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 57ºC por 30 segundos e extensão a 72ºC por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72ºC por 5 minutos (FERREIRA et al., 2010). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 150mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDocMP Imaging System, BIO RAD®).

4.4. PCR multiplex em tempo real quantitativa (qPCR) para *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

Nos ensaios de qPCR para os agentes *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. baseados no gene *groESL*, foram utilizadas reações com volume total final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise (**Tabela 1**), tampão da PCR (Go Taq Probe qPCR Master Mix, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos). As amostras foram testadas em duplicatas, e a quantificação do número de cópias de DNA-

alvo/µL foi realizada com a utilização de plasmídeos (IDT psmart, Integrated DNA Technologies®) contendo as sequências-alvo. Diluições seriadas foram feitas a fim de construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo as sequências-alvo (1,0 x 10^7 cópias/ µL a 1,0 x 10^0 cópias/ µL), a fim de se obter a eficiência e coeficiente de correlação das reações. A eficiência de amplificação (E) foi calculada a partir do *slope* da curva padrão de cada corrida utilizando a seguinte fórmula: $E = 10^{-1/slope}$. O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula (Xg/ µL DNA/ [tamanho do plasmídeo (pb) x 660]) x 6,022 x10^{23} x cópias do plasmídeo/µL.

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, sondas de hidrólise e condições térmicas de ciclagem utilizadas nos ensaios de qPCR Multiplex para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., baseada no gene *groESL*.

Agentes	Oligonucleotídeos iniciadores	Sonda de hidrólise (TaqMan)	Condições térmicas	Referências
***Ehrlichia* spp.**	5'-GCGAGCATAATTACTCAGAG-3' 5'-CAGTATGGAGCATGTAGTAG-3'	TET- 5'-CATTGGCTCTTGCTATTGCTAAT-3'[BHQ2a-Q]3'	- 95°C por 3 minutos; 40 ciclos: 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos	ANDRÉ, 2012
***Anaplasma* spp.**	5'-TTATCGTTACATTGAGAAGC-3' 5'GATATAAAGTTATTAAAAGTATAAAGC-3'	Cy-5- 5'-CCACCTTATCATTACACTGAGACG-3'[BHQ2a-Q]3'	- 95°C por 3 minutos; 40 ciclos: 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos	ANDRÉ, 2012

4.5. Reações de Amplificação para agentes *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseadas no gene 16S rRNA

Nos ensaios de convencional(c) PCR **para** *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseados no gene 16S rRNA foram utilizados 5µL de DNA de cada amostra. Os

oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR, bem como as sequências térmicas utilizadas para cada agente estão representados nos **Tabela 2.** Para as reações foram utilizados 1,25U Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), Tampão da PCR (PCR buffer 10 X – 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,6mM deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) e água ultra-pura esterilizada (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos) q.s.p. 25 µL. Nas reações de nested-PCR, foi utilizado 1µL do produto amplificado na primeira reação de PCR para a realização do segundo ensaio.

As amostras de DNA utilizadas como controle-positivos de *E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum* pelo Prof. Dr. John Stephen Dumler (University of Maryland, Baltimore, Maryland, Estados Unidos). DNA controle positivo de *E. canis* foi obtido a partir de células DH82 infectadas com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO em 1993 a partir de um cão atendido na rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP Jaboticabal (AGUIAR et al., 2007) e o DNA controle positivo de *A. platys* foi obtido a partir de cães com anaplasmose trombocítica atendidos na rotina ambulatorial do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP Jaboticabal (DAGNONE et al., 2009).

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, tamanhos dos amplímeros e condições térmicas utilizados nos ensaios de cPCR para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

Agente	Sequências dos oligonucleotídeos	Tamanho do amplímero (pb)	Condições térmicas	Referências
Ehrlichia spp. - ECC - ECB	5'- GAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' 5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3'	478	- 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	MURPHY et al., 1998
Nested *E. canis* - ECAN-5 -HE3	5'-CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA -3' 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'	358	- 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	MURPHY et al., 1998
Nested *E. chaffeensis* - CHAFF -GAIUR	5´- CAA TTGCTTATAACCTGGTTATAAAT-3´ 5´-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3´	410	- 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	KOCAN et al., 2000b
Nested *E. ewingii* - 18F - 1448R - Ewingii - GAIUR	5´- AGTTTGATCATGGCTCAG-3´ 5´- CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3´ 5´-CAATTCCTAAATAGTCTCTGACTATT-3´ 5´-GACTTTGCCGGGACTTCTTCT-3´	1440 412	- 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	PERSING, 1996
Anaplasma platys - Platys F - Platys-R	5´- AAGTGCAACGGATTTTTGTC-3´ 5´- CTTTAACTTACCGAACC-3´	504	- 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	INOKUMA et al., 2001
A. phagocytophilum - gE3a - gE10R - gE2 - gE9f	5´- CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3´ 5´- TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC´-3´ 5´- GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG-3´ 5´-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3´	932 546	- 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	MASSUNG et al., 1998

4.6. Caracterização molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseada nos genes *dsb*, *omp-1*, *groESL* e *msp-4*

As amostras positivas nos ensaios de qPCR e cPCR para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseados nos genes *groESL* e *16S rRNA,* respectivamente, foram submetidas a ensaios de PCR convencional baseadas nos genes *dsb*, *groESL*, *msp-4* e *omp-1*(**Tabela 3**).

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, tamanhos dos amplímeros e condições térmicas de ciclagem utilizadas na caracterização molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. pelos ensaios de cPCR baseadas nos genes *dsb*, *groESL*, *msp-4* e *omp-1.*

Agentes	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do amplímero (pb)	Sequências térmicas	Referências
Ehrlichia spp. (gene *dsb)*	5'- GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3' 5'- CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'	409	- 95°C por 2 minutos; 50 ciclos: 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 e 72°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos	DOYLE et al., 2005
Ehrlichia/ Anaplasma spp. (gene *groESL*)	5'-AITGGGCTGGTAITGAAAT-3' 5'- CCICCIGGIACIAIACCTTC-3' 5'-AT(A/T)GC(A/T)AA(G/A)GAAGCATAGTC-3' 5'- CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC-3'	1297	3 ciclos: 94°C por 1 minuto 48°C por 2 minutos e 72°C por 90 segundos; 37 ciclos: 94°C por 1 minuto, 48°C por 2 minutos, 72°C por 90 segundos e 72°C por 5 minutos.	SUMNER et al., 1997; NICHOLSON et al., 1999; LOTRIC-FURLAN et al., 1998
A. phagocytophilum (gene *msp-4*)	5'-ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG -3' 5'-TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG-3' 5'-CTATTGGYGGNGCYAGAGT -3' 5'-GTTCATCGAAAATTCCGTGGTA-3'	849 381	94°C por 5 minutos, 40 ciclos: 94°C por 10 seg, 58°C por 10 seg, 72°C por 50 seg e 72°C por 5 minutos.	DE LA FUENTE Et al., 2005; BOWN et al, 2007
Ehlichia spp. (gene *omp-1*)	5'-AT(C/T)AGT(G/C)AAA(A/G)TA(T/C)(A/G)T(G/A)CCAA-3' 5'-TTA(G/A)AA(A/G)G(C/T)AAA(C/T)CT(T/G)CCTCC-3' 5'-CAATGG(A/G)(T/A)GG(T/C)CC(A/C)AGA(AG)TAG-3' 5'-TTCC(T/C)TG(A/G)TA(A/G)G(A/C)AA(T/G)TTTAGG-3'	300	94°C por 3 minutos, 35 ciclos: 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.	INAYOSHI et al., 2004

4.7. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 150mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram então visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc™ MP Imaging System, BIO RAD®)

4.8. Ensaios de PCR em tempo real para *E. canis* (gene *dsb*), *E. chaffeensis* (gene *vlpt*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*)

As amostras positivas nos ensaios de qPCR e cPCR para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. baseados nos genes *groESL* e *16S rRNA,* respectivamente, foram submetidas a ensaios de qPCR específicos para *E. canis* (gene *dsb*), *E. chaffeensis* (gene *vlpt*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp-2*) (**Tabela 4**). Para as reações de amplificação realizadas utilizou-se volume total final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, 5µL de tampão da PCR (GoTaq Probe qPCR Master Mix, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos), sendo a quantificação do número de cópias de DNA-alvo/µL e cálculo da eficiência e coeficiente de correlação das

reações realizados com a utilização de diluições dos plasmídeos (IDT psmart, Integrated DNA Technologies®) contendo as sequências-alvo.

Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, sondas de hidrólise e condições térmicas de ciclagem utilizadas nos ensaios de qPCR específicos para *E. canis, E. chaffeensis* e *A. phagocytophilum.*

Agente	Sequências dos oligonucleotídeos	Sondas de Hidrólise	Sequências térmicas	Referências
E. canis (gene *dsb)*	5' –TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA – 3' 5' – GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA – 3'	5' FAM AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGT GAA-[BHQ – 1-3']	95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto	DOYLE et al., 2005
*E. chaffeensis (*gene *vlpt)*	5'- CTAATTCTGATTTACACGAGTCTTC-3' 5'- GCATCATCTTCGAATTGAACTTC-3'	5'[TAMRA] (TTGAGTGTCC[BHQ2a-Q]3'	95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 minutos e 55°C por 30 segundos	RELLER et al., 2009
A.phagocytophilum (gene *msp-2)*	5`-AGTTTGACTGGAACACACCTGATC-3 5`-CTCGTAACCAATCTCAAGCTCAAC-3`	5`[FAM] (939p-TTAAGGACAACATGCTTGTAGCTATGGAA G-GCA-[TAMRA])	50°C por2min, 95°Cpor 10 min, 40 ciclos de 95°C por15seg e 60°C por1min	DRAZENOVICH et al., 2006

4.9. Reação de sequenciamento

4.9.1. Purificação e quantificação dos amplímeros

Após a reação de PCR, foi realizada purificação dos produtos de PCR utilizando-se o kit "Silica Bead DNA Gel Extraction Kit" (Fermentas, São Paulo-SP), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de material genômico total do produto purificado foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.9.2 Sequenciamento e construção de árvores filogenéticas

Os produtos de PCR das amostras positivas foram submetidos ao

sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO - FCAV - UNESP), sendo realizado através de técnica automatizada baseada no método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados nos ensaios de PCR, conforme o gene em que foi baseada.

Os eletroferogramas gerados após as reações de sequenciamento foram avaliados com base na observação da qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada utilizando os softwares Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999) e *Phred/Phrap/Consed* softwares (GORDON et al., 1998; EWING et al., 1998; EWING eGREEN, 1998). O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), foi utilizado afim de comparar as sequências obtidas com aquelas previamente depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Posteriormente, as sequências salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado, retiradas do GenBank, utilizando os softwares Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999) e, posteriormente, o MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (Katoh et al., 2002). Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em modo Nexus, Phylip e Mega pelo site Alignment Transformation Enviroment (D. GLEZ-PEÑA et al., 2010).

O modelo evolutivo “*Best of It”* para cada matriz de dados gerada após os alinhamentos foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (DARRIBA et al., 2012; GUINDON et al., 2003), via portal CIPRES (MILLER et al., 2010). As análises de Máxima Verossimilhança (MV) foram realizadas pela plataforma IQ-TREE web

server (Trifinopoulos et al., 2016) e os índices de suportes dos clados foram avaliados através de análises de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 repetições.

A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (STOVER e MULLER, 2010).

5. RESULTADOS

5.1. Reação de Amplificação para o gene endógeno IRBP (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”).

Das 468 amostras de baço de roedores testadas, 98% (458/468) mostraram-se positivas na amplificação do gene endógeno IRBP (**Figura 2**). As médias de concentração de DNA por microlitro e relação 260/280 foram de 154,62 ng/µL DP ± 119,2 e 1,95 DP ± 0,609 respectivamente.

C+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 C-

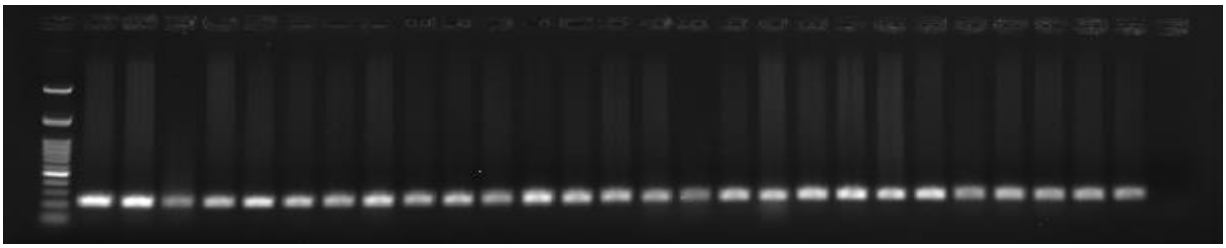


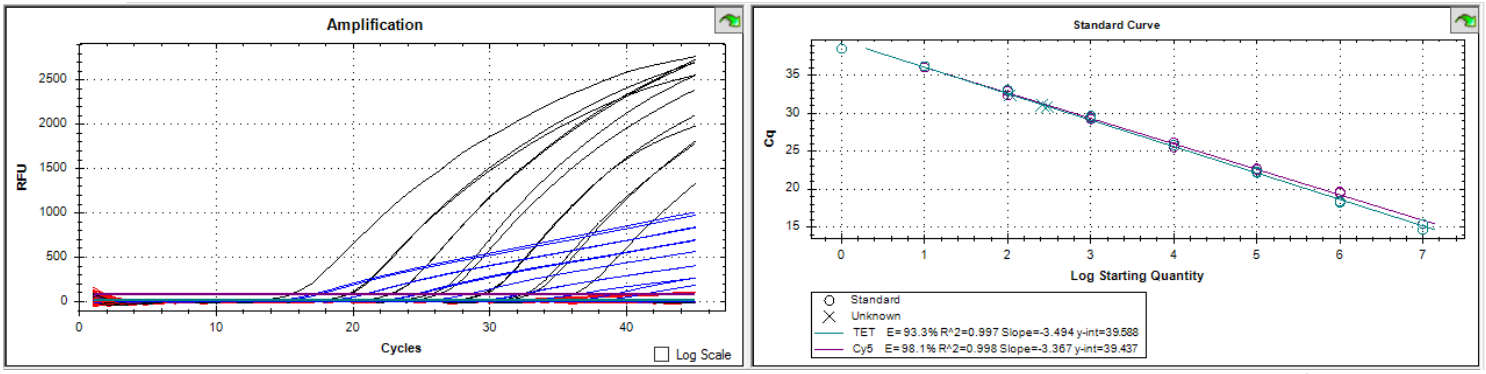
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo referente à amplificação do gene endógeno IRBP. M= marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®), 1-26 amostras positivas, C+: Controle positivo (amostra de DNA de roedor sabidamente positiva); C-: controle negativo (água esterilizada ultra-pura).

5.2. Detecção molecular de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. pela qPCR multiplex baseada no gene *groESL*

Das 458 amostras testadas, 2 (0,44%) e 11 (2,40) mostraram-se positivas na qPCR para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., respectivamente. Os ciclos de quantificações (Cq) médios das amostras positivas para *Ehrlichia* spp. foram de 31,77. Já a quantificação média do número de cópias de um fragmento do gene *groESL* por microlitro para *Ehrlichia* spp variou de 1,071 x 10^2 a 2,808 x 10^2 cópias. As amostras positivas para *Anaplasma* spp. tiveram médias de Cqs de 33,70, com número de cópias de um fragmento do gene *groESL* por microlitro variando de de 1,123 x 10^0 a 1,310 x 10^2 (**Tabela 5; Figura 3**).

Tabela 5. Resultados da detecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em roedores pela qPCR multiplex baseada no gene *groESL.*

Espécies de roedores	Bioma	Detecção (Fluoróforo)	Média de Cq	Quantificação Média (cópias/µL)
Thrichomys inermis	Caatinga	*Anaplasma* sp.(Cy5)	37,06	2.972 x 10^0



Thrichomys pachyurus	Pantanal	*Ehrlichia* sp.(TET)	32,50	1.071×10^{2}
Oecomys laticeps	Pantanal	*Ehrlichia* sp.(TET)	31,40	2.808×10^{2}
Calomys expulsus	Cerrado	*Anaplasma* sp.(Cy5)	35,70	6.971×10^{0}
Euryoryzomys russatus	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	31,28	1.310×10^{2}
			32,75	2.107×10^{1}
Akodon montensis	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	35,18	4.264×10^{0}
Euryoryzomys russatus	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	32,43	2.601×10^{1}
Akodon montensis	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	32,68	2.207×10^{1}
Euryoryzomys russatus	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	33,19	1.573×10^{1}
Euryoryzomys russatus	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	33,19	1.573×10^{1}
Thrichomys laurentius	Caatinga	*Anaplasma* sp.(Cy5)	33,95	9.55×10^{0}
Galea spixii	Caatinga	*Anaplasma* sp.(Cy5)	32,87	1.94×10^{1}
			34,04	8.99×10^{0}
Oligoryzomys nigripes	Mata Atlântica	*Anaplasma* sp.(Cy5)	37,06	2.972×10^{0}
Thrichomys inermis	Caatinga	*Anaplasma* sp.(Cy5)	37,06	2.972×10^{0}

Figura 3. Curvas de amplificação **(A)** e padrão **(B)** referentes à qPCR multiplex para *Ehrlichia* spp.e *Anaplasma* spp. baseada no gene *groESL* de amostras em duplicata

que mostraram diferença de Cq menor que 0,5. Em **A**, enquanto as curvas em preto representam a amplificação de plasmídeos (10^0 a 10^7) contendo um fragmento de 75pb do gene *groESL*de *Anaplasma* sp. (Cy5), as curvas em azul representam amplificação de plasmídeo (10^0 a 10^7) contendo um fragmento de 94pb do gene *groESL* de *Ehrlichia* sp. (TET). As curvas ou linhas em vermelho representam a amplificação de amostras de DNA de tecidos de roedores.

No total, foram realizados 15 ensaios de qPCR multiplex. A eficiência média de amplificação (*E*) dos ensaios de qPCR para *Ehrlichia* spp. foi de: E= 92.4% [(90.1 - 99.7%, SD ± 3.08); *slope* = -3,044; r^2= 0,989]. Para *Anaplasma* spp., a eficiência média foi de E= 95.9% [(90.4% - 102.4%, SD ± 3.55); *slope* = -3,447; r^2= 0,993] (**Tabela 6**). O limite de detecção nos ensaios de qPCR foi de 10 cópias de plasmídeo ou GBlock contendo o inserto-alvo por microlitro. Entretanto, uma amostra de DNA de roedor mostrou número de cópias de DNA menor que 10 cópias/µL para *Anaplasma* sp.

Tabela 6. Parâmetros dos ensaios de qPCR multiplex baseada no gene *groESL* para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em roedores.

Ensaio N°	Fluoróforo (Agente)	Eficiência (%)	R^2	Slope	y-Int
1	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	91,7	0,999	-3,831	41,857
	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,0	0,995	-3,588	38,733
2	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	98,1	0,998	-3,367	39,437
	TET (*Ehrlichia* spp.)	93,3	0,997	-3,494	39,588
3	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	95,1	0,997	-3,446	38,625
	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,8	0,999	-3,564	38,829
4	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	95,4	0,988	-3,437	38,853

5	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,1	0,998	-3,585	39,038
	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	96,8	0,994	-3,402	37,188
	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,1	0,996	-3,584	40,368
6	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	102,4	0,995	-3,265	38,116
	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,2	0,998	-3,581	39,836
7	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	90,4	0,986	-3,575	37,747
	TET (*Ehrlichia* spp.)	91,2	0,995	-3,552	39,242
8	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	95,8	0,996	-3,427	38,789
	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,3	0,998	-3,579	39,915
9	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	99,2	0,998	-3,340	38,419
	TET (*Ehrlichia* spp.)	94,6	0,984	-3,459	37,662
10	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	98,3	0,996	-3,363	38,516
	TET (*Ehrlichia* spp.)	93,5	0,990	-3,489	38,256
11	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	102,1	0,972	-3,273	37,452
	TET (*Ehrlichia* spp.)	92,8	0,973	-3,508	39,411
12	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	94,1	0,997	-3,473	38,632
	TET (*Ehrlichia* spp.)	99,7	0,932	-3,330	38,771
13	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	93,0	0,993	-3,502	37,382
	TET (*Ehrlichia* spp.)	98,5	0,987	-3,360	37,074
14	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	95,1	0,996	-3,446	39,681
	TET (*Ehrlichia* spp.)	91,1	0,994	-3,556	39,410
15	Cy5 (*Anaplasma* spp.)	90,9	0,995	-3,561	38,635
	TET (*Ehrlichia* spp.)	90,4	0,999	-3,576	39,107
MÉDIAS	**Cy5 (*Anaplasma* spp.)**	**95,9**	**0,993**	**-3,447**	**38,622**
	TET (*Ehrlichia* spp.)	**92,4**	**0,989**	**-3,044**	**39,016**

5.3. Detecção molecular de *Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp. por ensaios de cPCR

Do total de 458 amostras testadas, nove (1,96%) mostraram-se positivas para *Anaplasma* sp. com base na cPCR baseada no gene 16S rRNA. Cinco destas amostras pertenciam à espécimes de *Rattus rattus* capturados na cidade de Jaguaruana-CE (Caatinga), duas amostras de *Akodon* sp. capturados na cidade de

Teresópolis-RJ, uma de *Sphiggurus villosus* em Piraí-RJ e uma de *Calomys cerqueirae* capturado em Capitão Andrade-MG (Mata Atlântica).

Do total de 458 amostras testadas por ensaios de cPCR para *Ehrlichi*a sp. baseados no gene 16S *rRNA*, 1,09% (5/490) mostraram-se positivas. Os roedores positivos para *Ehrlichia* spp. foram amostrados nos biomas Pantanal (4/5) e Caatinga (1/5) **(Tabela 7).** A distribuição dos roedores positivos para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. com base nos ensaios de qPCR e cPCR está representada na **Figura 4**.

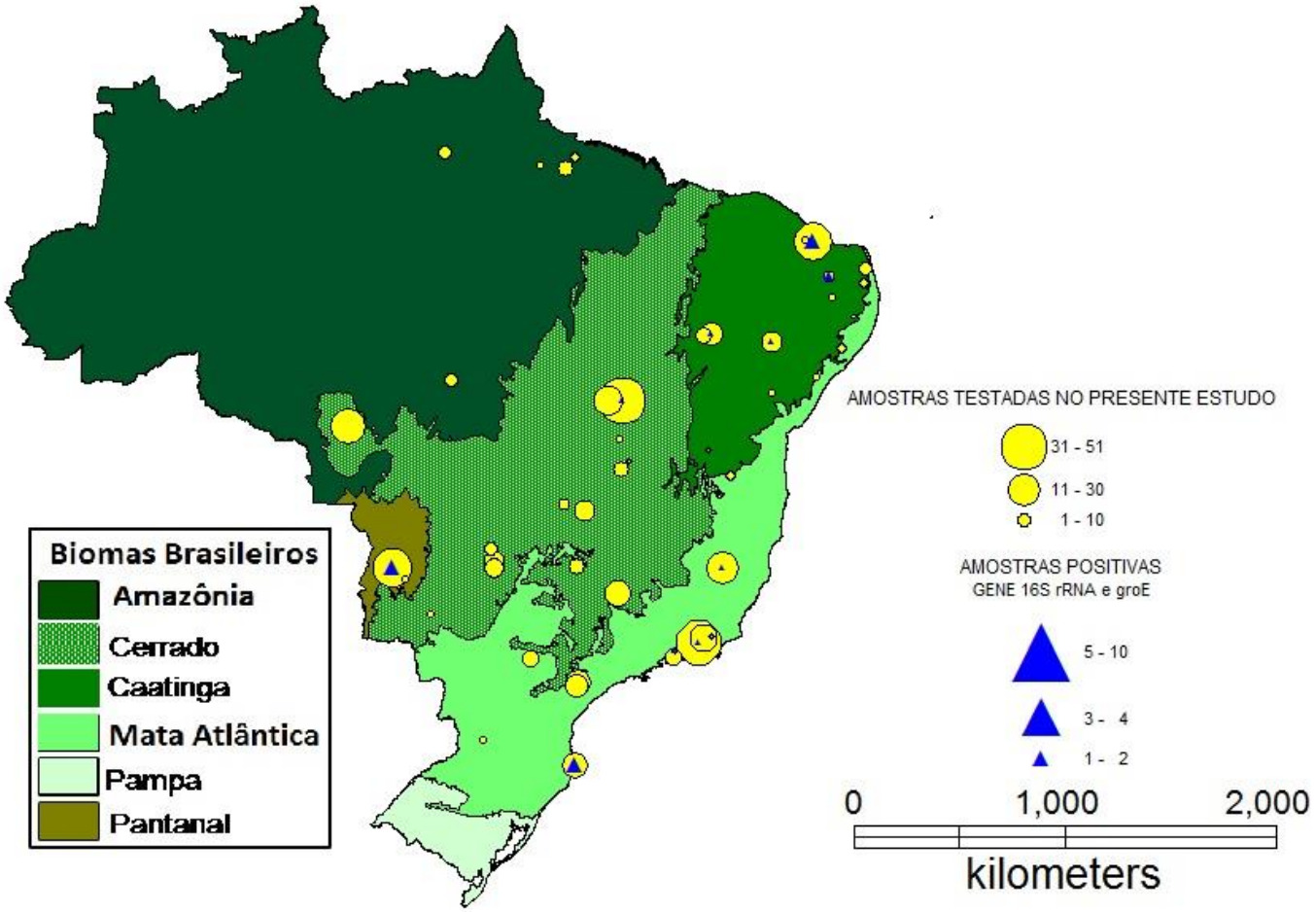


Figura 4. Distribuição dos roedores capturados (n=468) em cinco biomas brasileiros e amostras positivas para *Ehrlichia* e *Anaplasma* nos ensaios de cPCR, baseado no gene 16S *rRNA* e qPCE baseada no gene *groESL*. O georreferenciamento dos locais de captura dos roedores amostrados no presente estudo foi realizado através do software *MapInfo* 6.5.

Nenhuma das amostras positivas à qPCR multiplex baseada no gene *groESL* apresentou positividade para os ensaios de cPCR convencional baseados para *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., baseados em cinco diferentes regiões gênicas. Adicionalmente, não foi verificada copositividade para.*Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., tanto aos ensaios de qPCR Multiplex quando naqueles de cPCR baseados no gene 16S *rRNA*.

Tabela 7. Ocorrência de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. entre os roedores capturados nos diferentes biomas brasileiros.

Biomas	**Amostras positivas para *Ehrlichia* spp.**	**Amostras positivas para *Anaplasma* sp.**	**Total de Amostras Positivas por bioma**
Caatinga	1/1 *Trichomys laurentius*	5/9 *Rattus rattus*	6/458 (1,31%)
Mata Altântica		2/9 *Akodon montensis* 1/9 *Sphiggurus villosus* 1/9 *Calomys cerqueirai*	4/458 (0,87%)
Pantanal	1/4 *Holochilus fosteri* 2/4 *Clyomys laticeps* 1/4 *Calomys cerqueirai*		4/458 (0,87%)
TOTAL	**5/458 (1,09%)**	**9/458 (1,97%)**	**14/458 (3,06%)**

5.4. Sequenciamento e análises filogenéticas

Através da amplificação de fragmentos do gene 16S *rRNA* pela Nested PCR, foi observada positividade para *Anaplasma* spp. para amostras colhidas em nove roedores amostrados. Três destas amostras, apresentando alta intensidade de bandas, foram sequenciadas para a realização de análises filogenéticas.

Após o sequenciamento e análise pelo BLAST, observou-se identidade de 99% para amostra de *Anaplasma* sp. detectada em *Calomys cerqueirae* (B66) com genótipos de *A. phagocytophilum* (números de acesso no GenBank: KU705197.1 e KX646192.1), bem como para *Anaplasma* sp., detectada a partir de amostra de sangue colhida de um espécime de ganso do Orinoco (*Neochen jubata*) no Brasil (número de acesso no GenBank: KX886808.1).

Para a sequência de *Anaplasma* sp. detectada em *Rattus rattus* (B174), verificou-se 99% de identidade com fragmentos de DNA do gene 16S rRNA de *A. marginale* detectados em bovinos nas Filipinas, Uganda e na China (números de acesso: JQ839009.1, KU686794.1, FJ389579.1, respectivamente).

escalando paredes facilmente. Já foi registrado raras vezes longe de habitações humanas, em estradas por onde sejam transportados grãos ou outros itens que lhe podem servir de alimento. Nessas situações, abriga-se em troncos caídos.

A sequência de *Anaplasma* sp. detectada em um espécime de *Sphiggurus villosus* (B215) mostrou 99% de identidade com *Anaplasma* sp. detectada em espécime de *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) (número de acesso no GenBank: KJ831219.1) e 98% com sequências de *Anaplasma* sp. detectada em *M.*

gouazoubira no Brasil (KF020580.1) e *Anaplasma odocoilei* detectado em *Odocoileus hemionus columbianus* nos Estados Unidos (KT870134.1).

Por meio de inferências filogenéticas realizadas utilizando os métodos de Máxima Verossimilhança (MV), foi possível a construção de cladograma que mostrou forte correlação entre os genótipos de *Anaplasma* spp. detectados nos espécimes de roedores amostrados (provenientes dos biomas Mata Atlântica e Caatinga) com amostras de *A. phagocytophilum* (LC012812.1), *A. marginale* e *A. odocoilei*, sendo possível observar topologia semelhante entre os cladogramas **(Figura 5)**. Sequências parciais de *E. canis* (NC007100.1), *E. chaffeensis* (NR037059) e *E. ewingii* (U96436.1) foram utilizadas como grupos externos para a construção do cladograma.

Através da amplificação de fragmentos do gene 16S *rRNA* pela Nested-PCR foi observada positividade para *Ehrlichia* spp. para as amostras de baço coletadas de cinco roedores amostrados. As sequências obtidas neste estudo mostraram identidade de 99% com sequências de *E.* canis (números de acesso no GenBank KP844663.1; KF972450.1 e AB723708.1) pela análise ao software BLAST. A inferência filogenética realizada, utilizando tanto o método de MV quanto BI, mostrou que as sequências de *Ehrlichia* sp. detectadas no presente estudo foram alocadas em um mesmo clado de sequências de *E. canis* obtidas no Brasil (DQ915970.1), Peru (DQ915970.1), Índia (LC053451.1), Taiwan (EU106856.1) e sequência do gene 16S rRNA do genoma completo da amostra Jake de *Ehrlichia canis*, isolada de um cão (NC_007354.1). Ainda, foi possivel observar a proximidade filogenética com sequências de *Ehrlichia* spp. obtidas a partir de felídeos selvagens no Brasil

(EU376114.1; EU376115.1; EU376116.1) (**Figura 6**). Sequências parciais de *A. phagocytophilum* (NR044762.1), *A. odocoilei* (DQ007352.1), *A. bovis* (LC012812.1) e *Anaplasma marginale* (LC007100.1) foram utilizadas como grupo externo.

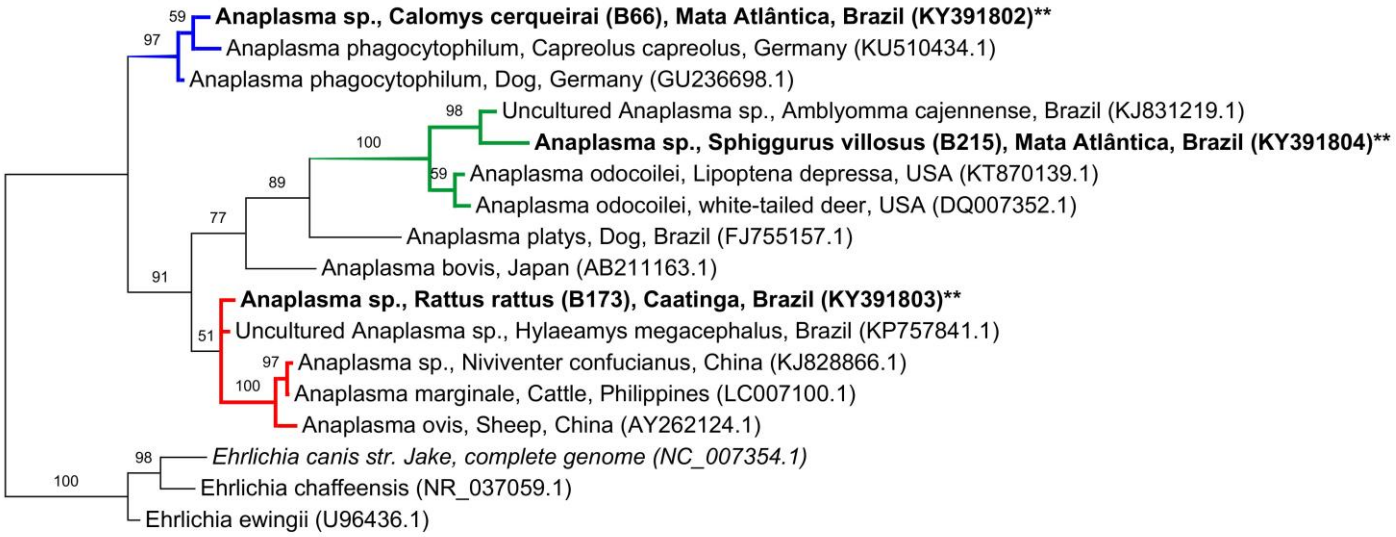


Figura 5. Posição filogenética de sequências de *Anaplasma* spp. utilizando o método de Máxima Verossimilhança e modelo GTR+I+R. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.

Em negrito*: sequências do presente estudo.

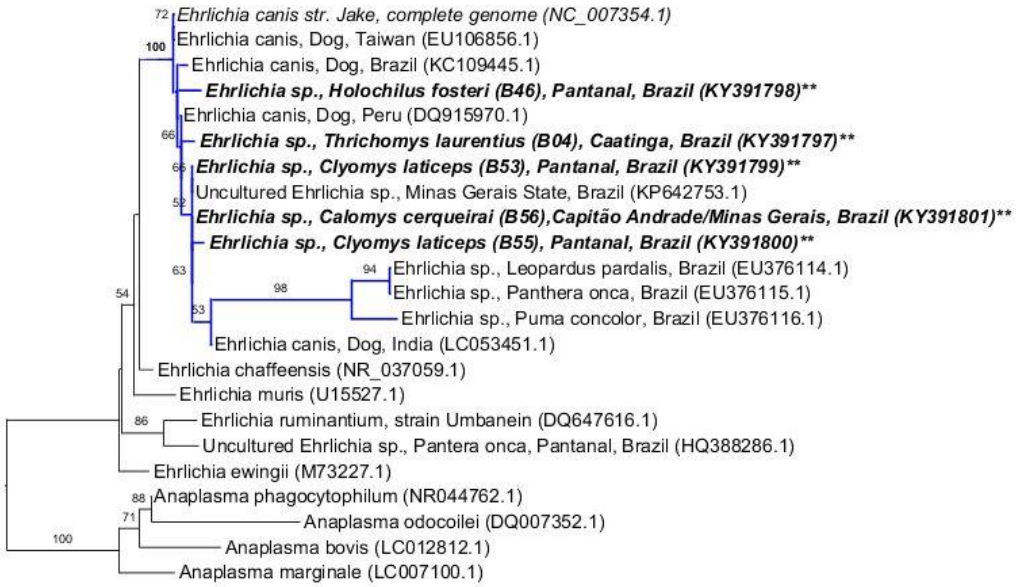


Figura 6. Posição filogenética de sequências de *Ehrlichia* spp. utilizando o método de Máxima Verossimilhança e modelo TIM2+R2+F. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* acima de 50 para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências.

Em negrito*: sequências do presente estudo.

6. DISCUSSÃO

Os dados obtidos pelos ensaios de multiplex qPCR revelaram uma baixa ocorrência de *Ehrlichia* spp. (0,44% [2/458]) e *Anaplasma* spp. (2,40% [11/458]) nas amostras de baço colhidas de roedores em diferentes localidades do Brasil. Apesar disto, foi possível observar a ocorrência de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em diferentes espécies de roedores, provenientes de diferentes regiões. Tais achados mostraram-se semelhantes àqueles encontrados por Chastagner et al. (2016) na França, os quais observaram diferenças na ocorrência de *A. phagocytophilum* em espécimes de *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* e *M. glareolus*, a depender das espécies de roedores amostrados em diferentes localidades e também em diferentes estações do ano. Na Alemanha, Obiegala et al. (2014) também encontraram uma baixa ocorrência (1,1% [7/631]) para *A. phagocytophilum* utilizando ensaios de qPCR baseados no gene *msp2* em amostras de baço de roedores das espécies *A. sylvaticus*, *M. glareolus* e *A. flavicollis*. Da mesma forma, Blanarová et al. (2014) também relataram baixa ocorrência (0,2% [1/606]) de *A. phagocytophilum* em roedores (*A. agrarius*, *A. flavicollis* e *M. glareolus*) capturados na região central da Europa, utilizando ensaios de qPCR baseados no gene *msp-2*. Por outro lado, Kim et al. (2006) observaram alta ocorrência para *Anaplasma* sp./*Ehrlichia* spp. (70,5% [299/424]), por meio de ensaios de qPCR baseados no gene 16S *rRNA*. Ainda, ensaios de PCR convencional seguidos por sequenciamento discriminaram a circulação de *A. phagocytophilum* (88/424 [20,7%]), *A. platys* (68/424 [16%]), *E. canis* (51/424 [12,0%]), *E. ewingii* (26/424 [6,1%]), e *E. chaffeensis* (8/424 [1,9%]) em espécimes de *A. agrarius*

capturados na República da Coréia (Kim et al., 2006). Nos Estados Unidos, Foley e Nieto (2011) observaram maior ocorrência de *A. phagocytophilum* em roedores quando comparado ao presente estudo e aqueles realizados na Europa. No referido estudo, 10,6% (15/141) de positividade para *A. phagocytophilum* foi encontrada entre roedores da espécie *T. ochrogenys* amostrados no estado da Califórnia, por meio de ensaios de qPCR baseados no gene *msp-2*. Ainda na Califórnia, Foley et al. (2011) relataram ocorrência semelhante de *A. phagocytophilum* em amostras de baço colhidas de roedores das espécies *N. fuscipes* [11,8% (4/42)] e *T. ochrogenys* [8,9% (6/81)], utilizando ensaios de qPCR baseados no gene *msp-2*.

As análises filogenéticas baseadas em um fragmento (546pb) do gene 16S *rRNA* posicionaram as sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em *Calomys cerqueirai*, próximas às seqüências de *A. phagocytophilum*. Esta espécie de roedor apresentam hábito terrestre e habita formações florestais e abertas da Caatinga, do Cerrado e do Pantanal, além de algumas formações florestais da Mata Atlântica em seu limite com o Cerrado (BONVICINO et al., 2008). Por outro lado, os genótipos de *Anaplasma* sp. detectados em *Sphiggurus villosus* foram alocados em um mesmo clado relacionados com *A. odocoilei.* Roedores da espécie *Sphiggurus villosus* apresentam hábito arborícola e habitam formações florestais da Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado (BONVICINO et al., 2008). As sequências parciais de DNA de *Anaplasma* obtidas a partir de uma amostra de baço de *Rattus rattus* alocaram-se próximas a *A. bovis*. Diferentemente das outras espécies de roedores que habitam ambiente de mata, *R. rattus* são encontrados em lugares secos, em habitações humanas, armazéns de grãos e entre pavimentos (BONVICINO et al., 2008).

Genótipos de *Anaplasma* relacionados a *A. phagocytophilum* já foram detectados em carnívoros selvagens (André et al., 2012), veados (Silveira et al., 2012) e aves selvagens (Machado et al., 2012), bem como em gatos domésticos (André et al., 2014) no Brasil.

Ainda, foi observado que as amostras positivas pelos ensaios de qPCR e cPCR com base nos genes *groESL* e 16S *rRNA*, respectivamente, mostraram-se negativas em ensaios de qPCR específicas para *A. phagocytophilum* baseados no gene *msp-2*. Esses achados indicam possível circulação de diferentes genótipos de *Anaplasma* em animais selvagens no Brasil, cujo potencial zoonótico e patogênico ainda é desconhecido. No Brasil, *A. phagocytophilum* já foi detectado em cães e veados, com base em ensaios de PCR direcionados aos genes *msp-2* e *msp-4*, respectivamente (Santos et al., 2013; Silveira et al., 2014; 2015).

Considerando a baixa ocorrência de *Anaplasma* entre os roedores amostrados, é possível inferir que este grupo de mamíferos pode não desempenhar um papel importante na epidemiologia das espécies de *Anaplasma* no Brasil. Por outro lado, roedores das espécies *N. fuscipes* e *Peromyscus* spp. são reconhecidas como importantes fontes de infecções para as amostras HZ, MRK e Dog_CA de *A. phagocytophilum* nos EUA.

As inferências filogenéticas baseadas em um fragmento (358pb) do gene 16S *rRNA* posicionaram as sequências de *Ehrlichia* obtidas a partir de amostras de baço de roedores das espécies *Trichomys laurentius*, *Holochilus fosteri*, *Clyomys laticeps* e *Calomys cerqueirai* em um mesmo grupo monofilético, juntamente com outras sequências de *E. canis*. Roedores da espécie *Trichomys laurentius* apresentam

hábito terrestre e semi-arborícola, diurno e noturno, mas preferencialmente crepuscular, habitando áreas abertas e florestais da Caatinga, do Cerrado e do Pantanal. Já os roedores da espécie *Holochilus fosteri* apresentam hábito semiaquático e habitam formações florestais da Caatinga, do Cerrado e da Mata Atlântica. Espécimes de *Clyomys laticeps* são semifossórias, e encontrados habitando formações vegetais abertas e semiflorestais, como campos limpos e sujos, campo cerrado, cerrado *sensu stricto*, e área de transição com matas de galeria do Cerrado e Pantanal (BONVICINO et al., 2008). No Brasil, genótipos de *Ehrlichia* spp. relacionados a *E. canis* já foram detectados em carnívoros selvagens (André et al., 2012), aves selvagens (Machado et al., 2012) e gatos domésticos (André et al., 2015). Similarmente, Kim et al. (2014) também observaram a ocorrência de genótipos relacionados a *E. canis* em roedores na Coréia.

Semelhantemente ao observado com os genótipos de *Anaplasma* detectados no presente estudo, as amostras positivas nos ensaios qPCR e cPCR para *Ehrlichia* spp. (com base nos genes *groESL* e 16S *rRNA,* respectivamente) mostraram-se negativas aos ensaios de qPCR específicos para *E. canis* e *E. chaffeensis* (baseados nos genes *dsb* e *vlpt*, respectivamente), sugerindo mais uma vez a possível circulação de genótipos de *Ehrlichia* ainda não isolados em roedores.

A negatividade observada em ensaios de cPCR baseados no gene 16S *rRNA* para amostras que anteriormente mostraram-se positivas aos ensaios de qPCR multiplex baseados no gene *groESL* pode ser explicada pela observação de baixas quantificações de DNA, indicando baixas cargas bacterianas nas amostras de tecido de roedores. Isto pode ter impedido a amplificação por ensaios de PCR

convencionais, haja vista a menor sensibilidade dos ensaios de cPCR quando comparados aos ensaios de multiplex qPCR.

Uma vez que a obtenção de sequências parciais dos genes *dsb*, *groESL*, *omp-1*, *msp-4* pela amplificação por meio de ensaios de cPCR não foi alcançada no presente estudo, apesar de várias tentativas, um preciso posicionamento filogenético dos genótipos de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. não foi possível. Similarmente, Wolf et al. (2016), ao relatarem a ocorrência de um genótipo de *Anaplasma* sp. em um espécime de *H. megacephalus* por PCR convencional baseada no gene 16S rRNA, não apresentaram um posicionamento filogenético preciso da seqüência encontrada, haja vista a limitação de não obtenção outros fragmentos gênicos.

Além disso, embora cinco amostras tenham se mostrado positivas na cPCR para *Ehrlichia* sp. baseada no gene *16S* rRNA e nove para *Anaplasma* sp., todas mostraram-se negativas aos ensaios de qPCR multiplex baseados no gene *groESL*. Tal resultado pode representar mais um indicativo da ocorrência de genótipos de *Anaplasma* e *Ehrlichia* diferentes das espécies-tipo para as quais o ensaio foi desenhado. Uma vez que os iniciadores e as sondas de hidrólise utilizados nos ensaios qPCR foram concebidos com base em sequências do gene codificador da proteína de choque térmico *(heat shock protein*) de seis espécies já conhecidas de *Anaplasma* e quatro espécies de *Ehrlichia*, acreditamos que não houve anelamento destes oligonucleotídeos e sondas de hidrólise aos fragmento-alvo dos novos genótipos circulantes em roedores. Por outro lado, a amplificação bem sucedida no ensaio de PCR convencional baseado no gene 16S *rRNA* pode ser explicada

considerando que o referido gene apresenta-se mais conservado entre as diferentes espécies de agentes Anaplasmataceae em comparação ao gene *groESL*.

As espécies de carrapatos possivelmente envolvidas nos ciclos de transmissão de espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em roedores permanecem desconhecidas no Brasil. No que diz respeito às espécies de ixodídeos parasitas de roedores no Brasil, ninfas de *Amblyomma dubitatum* e *Ixodes loricatus* e larvas de *Amblyomma* spp. e *Ixodes* spp. foram encontrados parasitando pequenos mamíferos nas áreas peri-urbanas de Uberlândia, estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil (Coelho et al., 2016). Adicionalmente, foram colhidas ninfas de *A. cajennense* e *A. triste* em exemplares de roedores da espécie *Holochilus sciureus* amostrados no Pantanal do estado de Mato Grosso (Wolf et al., 2016).

Sabe-se que a organização de comunidades de ectoparasitas encontradas em roedores é dependente das espécies hospedeiras. Desta forma, ácaros e piolhos apresentam maior especificidade quanto às espécies hospedeiras quando comparados aos carrapatos (Sponchiado et al., 2016). Desta forma, a menor especificidade dos carrapatos em relação aos hospedeiros mamíferos seria um fator importante à transmissão de *Ehrlichia* e *Anaplasma* para diferentes espécies de roedores. Foi possível observar também que grande parte das espécies de roedores amostrados que mostraram-se positivas para *Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp. apresentam hábito terrestre, o que aumenta as chances de contato com espécies de carrapatos na vegetação. No Brasil, um fragmento do gene 16S *rRNA* de *Anaplasma* foi detectado em um espécime de *Amblyomma triste* colhido de um roedor da espécie *Holochilus sciureus* no Pantanal do estado do Mato Grosso, sendo também

observado positividade deste espécime de roedor ao mesmo ensaio de PCR (Wolf et al., 2016). No estado da Califórnia, EUA, foram colhidos espécimes de *I. pacificus* (126), *I. angustus* (24), *I. ochotonae* (2) e *I. spinipalpis* (2) de roedores das espécies *T. ochrogenys*, considerados potenciais reservatórios do agente, e foi observado que apenas um exemplar de *I. pacificus* mostrou-se positivo à detecção de *A. phagocytophilum* (Foley e Nieto, 2011). Ainda na Califórnia, de 628 carrapatos amostrados e testados quanto à presença de DNA de *A. phagocytophilum*, oito exemplares de *I. pacificus* (um adulto, uma larva e 6 ninfas) e dois adultos de *I. ochotonae* mostraram-se positivos para o referido agente (Foley et al. , 2011). Futuros estudos que objetivem a detecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em carrapatos colhidos de roedores no Brasil são necessários a fim de elucidar as lacunas existentes na epidemiologia dos agentes Anaplasmataceae no Brasil.

7. CONCLUSÕES

- O presente estudo mostrou uma baixa ocorrência de *Anaplasma* e *Ehrlichia* em roedores amostrados em diferentes regiões do Brasil;

- Com base nos resultados obtidos pelos ensaios de qPCR multiplex (gene *groESL*) e cPCR (gene 16S *rRN*A), bem como no posicionamento filogenético das sequências do 16S *rRNA*, sugere-se a circulação de possíveis novos genótipos de agentes Anaplasmataceae em roedores nas áreas estudadas, porém com baixas cargas bacterianas.

8. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673–4680, 1990.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; SILVA, K.F.; NAKAGHI, A.C.H. Molecular and Serologic Detection of Ehrlichia spp. in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 46, p. 1017–1023, 2010.

ANDRÉ, M.R.; DENARDI, N.C.B.; DE SOUSA, K.C.M.; GONÇALVES, L.R.; HENRIQUE, P.C.; ONTIVERO, C.R.G.R.; GONZALEZ, I.H.L.; NERY, C.V.C.; CHAGAS, C.R.F.; MONTICELLI, C.; SANTIS, A.C.G.A.; MACHADO, R.Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 5, p. 545–551, 2014.

ANDRÉ, M.R.; DUMLER, J.S.; SCORPIO, D.G.; TEIXEIRA, R.H.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 3, p. 247-53, 2012.

ANDRÉ, M.R.; HERRERA, H.M.; FERNANDES, S.J.; DE SOUSA, K.C.; GONÇALVES, L.R.; DOMINGOS, I.H.; DE MACEDO, G.C.; MACHADO, R.Z.; Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 6, p. 779-786, 2015.

BAKKEN, J. S.; DUMLER JS. Human granulocytic ehrlichiosis. **Clin Infect Dis**. v. 31, n. 2, p. 554-560, 2000.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E.J.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; GUGLIELMONE, A.A.; CÁCERES, A.G.; GUZMAN-CORNEJO, C.; LEÓN, R.; DURDEN, L.A.; FACCINI, J.L.H. Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **Biomedical Central Evolutionary Biology**. v. 13, p. 1-20, 2013.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 4172-4177, 2013.

BLAŇAROVÁ, L.; STANKO, M.; CARPI, G.; MIKLISOVÁ, D.; VÍCHOVÁ, B.; MOŠANSKÝ, L.; BONA, M.; DERDÁKOVÁ, M. Distinct Anaplasma phagocytophilum genotypes associated with Ixodes trianguliceps ticks and rodents in Central Europe. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 5, n. 6, p. 928-938, 2014.

BLANAROVÁ, L.; STANKOA, M.; CARPI, G.; MIKLISOVÁ, D.; VÍCHOVÁ, B.; MOSANSKY, L.; BONA, M.; DERDÁKOVÁ, M. Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 5, p. 928–938, 2014.

BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, P.S. In: Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos, 120 p. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.

BOUZA-MORA, L,; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZUÑIGA, J.J.; SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 8, n.1, p. 36-40, 2017.

BOUZA-MORA, L.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZUÑIGA, J.J.; SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica.

Ehrlichia species in Rhipicephalus sanguineus ticks in Cameroon. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 8, n. 1, p. 36-40, 2017.

BOWN, K.J.; LAMBIN, X.; OGDEN, N.H.; PETROVEC, M.; SHAW, S.E.; WOLDEHIWET, Z.; BIRTLES, R.J. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 1771–1776, 2007.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55, p. 611-622, 2009.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.B.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R.C.; WALKER, D.H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, p. 259-262, 2004.

CHAE, J.S.; YU, D.H.; SHRINGI, S.; KLEIN, T.A.; KIM, H.C.; CHONG. S.T.; LEE, I.Y.; FOLEY, J. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ, Korea. **J Vet Sci.** v.9. n. 3, p. 285-293, 2008.

CHASTAGNER, A.; MOINET, M.; PEREZ, G.; ROY, E.; MCCOY, K.D.; PLANTARD, O.; AGOULON, A.; BASTIAN, S.; BUTET, A.; RANTIER, Y.; VERHEYDEN, H.; C`*E*BE, N.; LEBLOND, A.; VOURC'H, G. Prevalence of Anaplasma phagocytophilum in small rodents in France.Ticks and Tick-borne Diseases. **http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.005**.

COELHO, M.G.; RAMOS, V.N.; LIMONGI, J.E.; LEMOS, E.R.S.; GUTERRES, A.; NETO, S.F.C.; ROZENTAL, T.; BONVICINO, C.R.; D'ANDREA, P.S.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**. v. 10, p. 275-282, 2016.

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

COSTA-JÚNIOR, L.M.; REMBECK, K.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F. Factors associated with epidemiology of Anaplasma platys in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Prev Vet Med**. v. 1, n. 109, 2012.

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

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

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

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods***.* v. 9, p. 772, 2012.

DE LA FUENTE, J.; MASSUNG, R.F.; WONG, S.J.; CHU, F.K.; LUTZ, H.; MELI, M.; VON LOEWENICH, F.D.; GRZESZCZUK, A.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; MANGOLD, A.J.; NARANJO, V.; STUEN, S.; KOCAN, K.M. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 1309–1317, 2005.

DELOS SANTOS, J.R.; BOUGHAN, K.; BREMER, W.G.; RIZZO, B.; SCHAEFER, J.J.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R; CAPITINI, L.A.; ANDERSON, D.E.; OGLESBEE, M.; EWING, S.A.; STICH, R.W. Experimental infection of dairy calves with Ehrlichia chaffeensis. **J Med Microbiol**. v. 56, p. 1660-1668, 2007.

DOUDIER B., OLANO J.; PAROLA P.; BROUQUI P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Veterinary Parasitology**. v. 167, p. 149–154, 2010.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCK, K.C.; LI, P.; WALKER, D.C.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taq-Man Real Time PCR of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**. v. 7, p. 504-510, 2005.

DRAZENOVICH, N.; FOLEY, J.E.; BROWN, R.N. Use of real-time quantitative PCR targeting the msp2 protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 6, p. 83-90, 2006.

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

DUMLER, J.S.; CHOI, K.S.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BARAT, N.S.; SCORPIO, D.G.; GARYU, J.W.; GRAB, D.J.; BAKKEN, J.S. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging infections diseases**, v. 11, n. 12, p. 1828-1834, 2005.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II. Error probabilities. Genome Res. v. 8, p. 186-194, 1998.

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

FERREIRA, E.C.; GONTIJO, C.M.; CRUZ, I.; MELO, M.N.; SILVA, A.M. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, p. 895-898, 2010.

FOLEY, J.E.; KRAMER, V.; WEBER, D. Experimental Infection of dusky-footed wood rats (*Neotoma Fuscipes)* with E*hrlichia phagocytiphila* sensu lato. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 38, p. 194–198, 2002.

FOLEY, J.E.; NIETO, N.C. The ecology of tick-transmitted infections in the redwood chipmunk (*Tamias ochrogenys*). **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 2, p. 88–93, 2011.

FOLEY, J.E.; NIETO, N.C.; ADJEMIAN, J.; DABRITZ, H.; BROWN, R.N. *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Small Mammal Hosts of Ixodes Ticks, Western United States. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, p. 1147-1150, 2008.

FOLEY, J.E.; REJMANEK, D.; FLEER, K.; NIETO, N.C. Nidicolous ticks of small mammals in *Anaplasma phagocytophilum*-enzootic sites in northern California. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 2, p. 75–80, 2011.

GLEZ-PEÑA, D.; GÓMEZ-BLANCO, D.; REBOIRO-JATO, M.; FDEZ-RIVEROLA, F.; POSADA D. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research**. v. 38, p. 14-18, 2010.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. *Consed*: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. v. 8, p. 195-202, 1998.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology**. v. 52, p. 696-704, 2003.

HALL TA. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **Int J Parasitol**. v. 35, p. 1309-1318, 2005.

HEO, E.J.; PARK, J.H.; KOO, J.R.; PARK, M.S.; PARK, M.Y.; DUMLER, J.S.; CHAE, J.S. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3082-3085, 2002.

HERRERA, H.M.; NOREK, A.; FREITAS, T.P.T.; RADEMAKER, V.; FERNANDES, O.; JANSEM, A.M. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. **Parasitology Research**. v. 96, p. 121-126, 2005.

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

ISMAIL, N.; BLOCH, K.C.; MCBRIDE, J.W. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 30, p. 261–292, 2010.

JAHFARI, S.; FONVILLE, M.; HENGEVELD, P.; REUSKEN, C.; SCHOLTE, E.J.; TAKKEN, W.; HEYMAN, P.; MEDLOCK, J.M.; HEYLEN, D.; KLEVE, J.; SPRONG, H. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from Northwest Europe. **Parasites and Vectors**. v. 5, p. 74, 2012.

KALLIO, E.R.; BEGON, M.; BIRTLES, R.J.; BOWN, K.J.; KOSKELA, E.; MAPPES, T.; WATTS, P.C. First report of Anaplasma phagocytophilum and Babesia microti in rodents in Finland. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v. 14, n. 6, p.389-393, 2014.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**. v. 30, p. 3059-3066, 2002.

KIM, C.M.; KIM, M.S.; PARK, M.S.; PARK, J.H.; CHAE, J.S. Identification of Ehrlichia chaffeensis, Anaplasma phagocytophilum, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and I*xodes persulcatus* Ticks from Korea*.* **Vector-Borne and Zoonotic Diseases***.* v. 3, p. 17-26, 2004*.*

KIM, C.M.; YI, Y.H.; YU, D.H.; LEE, M.J.; CHO, M.R.; DESAI, A.R.; SHRINGI, S.; KLEIN, T.A.; KIM, H.C.; SONG, J.W.; BAEK, L.J.; CHONG, S.T.; O'GUINN, M.L.; LEE, J.S.; LEE, I.Y.; PARK, J.H.; FOLEY, J.; CHAE, JS. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, p. 5766-5776, 2006.

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

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**. v.6, p. 1121-1140, 2010.

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

MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; DE SOUSA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JUNIOR, J.R. Migratory and carnvorous birds in Brazil: reservoirs for Anaplasma and Ehrlichia species? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 12, p. 705-708, 2012.

MARTINS, T.F.; BARBIERI, A.R.; COSTA, F.B.; TERASSINI, F.A.; CAMARGO, L.M.; PETERKA, C.R.; DE C PACHECO, R.; DIAS, R.A.; NUNES, P.H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A.K.; HORTA, M.C.; GUILLOUX, A.G.; BENATTI, H.R.;

RAMIREZ, D.G.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Geographical distribution of Amblyomma cajennense (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of A. cajennense (sensu stricto). **Parasites and Vectors**. v. 31, n.9, p. 186, 2016.

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**. v. 36, p. 1090–1095, 1998.

MELO, A.L.; WITTER, R.; MARTINS, T.F.; PACHECO, T.A.; ALVES, A.S.; CHITARRA, C.S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Med Vet Entomol**. v. 30, n. 1, p. 112-116, 2016.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. “Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees”, in: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, LA, 1-8, 2010.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F.S.; COSTA, F.B.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the Rhipicephalus sanguineus Group for the Bacterium Ehrlichia canis, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **PLoS One**. v. 10, n. 9, 2015.

MOUSTAFA, M.A.; LEE, K.; TAYLOR, K.; NAKAO, R.; SASHIKA, M.; SHIMOZURU, M.; TSUBOTA, T. Molecular characterization and specific detection of Anaplasma species (AP-sd) in sika deer and its first detection in wild brown bears and rodents in Hokkaido, Japan. **Infect Genet Evol**. v. 36, p. 268-74, 2015.

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

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) with the description of three new species, Amblyomma

tonelliae n. sp., Amblyomma interandinum n. sp. and Amblyomma patinoi n. sp., and reinstatement of Amblyomma mixtum Koch, 1844, and Amblyomma sculptum Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 5, p. 252-276, 2014.

NDIP, L.M.; NDIP, R.N.; NDIVE, V.E.; AWUH,J.A.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Ehrlichia species in Rhipicephalus sanguineus ticks in Cameroon. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v. 7, n. 2, p. 221-227, 2007.

NICHOLSON, W.L.; CASTRO, M.B.; KRAMER, V.L.; SUMNER, J.W.; CHILDS, J.E.; Dusky-Footed Wood Rats (*Neotoma fuscipes*) as Reservoirs of Granulocytic Ehrlichiae (*Rickettsiales*: *Ehrlichieae*) in Northern California. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3323–3327, 1999.

NIETO, N.C.; FOLEY, J.E. Reservoir Competence of the Redwood Chipmunk (*Tamias Ochrogenys*) for *Anaplasma Phagocytophilum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 9, p. 573-577, 2009.

NIETO, N.C.; LEONHARD, S.; FOLEY, J.E.; LANE, R.S. Coinfection of western gray squirrel (*Sciurus griseus*) and other sciurid rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 46, p. 291-296, 2010.

OBIEGALA, A.; PFEFFER, M.; PFISTER, K.; TIEDEMANN, T.; THIEL, C.; BALLING, A.; KARNATH, C.; WOLL, D.; SILAGHI, C. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and Ixodid ticks. **Parasites and Vectors**. v. 7, p. 563, 2014.

OLIVEIRA, R.C.; TEIXEIRA, B.R.; MELLO, F.C.A.; PEREIRA, A.P.; DUARTE, A.S.; BONALDO, M.; BONVICINO, C.R.; D`ANDREA, O.S.; LEMOS, E.R.S. Genetic characterization of a juquitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**. p. 112, v. 212-218, 2009.

PAULAUSKAS, A.; RADZIJEVSKAJA, J.; ROSEF, O. Molecular detection and characterization of Anaplasma phagocytophilum strains. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. v. 35, n. 2, p. 187-95, 2012.

PELEG, O.; BANETH, G.; EYAL, O.; INBAR, J.; HARRUS, S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary Parasitology**. v. 173, p. 292–299, 2010.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1078, p. 110-117, 2006.

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

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia"* bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infections, Genetics ans Evolution**. v. 11, p. 1842–1861, 2011.

REJMANEK, D.; FOLEY, P.; BARBET, A.; FOLEY, J.E. Antigen variability in *Anaplasma phagocytophilum* during chronic infection of a reservoir host. **Microbiology**. v. 158, p. 2632–2641, 2012.

REJMANEK, D.; NIETO, N.C.; BARASH, N.; FOLEY, J.E. Temporal patterns of tick-borne granulocytic anaplasmosis in California. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 2, p. 81–87, 2011.

RELLER, M.E.; CLEMENS, E.G.; PRAKASH, J.A.; DUMLER, J.S. Assessment of a quantitative multiplex 5_ nuclease PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum*. In: **23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology**, Hilton Head Island, SC, Abstract No. 51, 2009.

RIZZOLI, A.; SILAGHI, C.; OBIEGALA, A.; RUDOLF, I.; HUBÁLEK, Z.; FÖLDVÁRI, G.; PLANTARD, O.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BONNET, S.; ŠPITALSKÁ, E.; KAZIMÍROVÁ, M. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. **Frontiers in Public Health**. v. 2, p. 1-26, 2014.

RUSSART, N.M.; DOUGHERTY, M.W.; VAUGHAN, J.A; Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and tick-borne pathogens in North Dakota. **J Med Entomol**. v. 51, n. 5, p. 1087-1090, 2014.

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

SANCHES, G.S.; ÉVORA, P.M.; MANGOLD, A.J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v. 215, p. 78-87, 2016.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.V.; COSTA, R.L.; SANTOS, T.M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.H.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites and Vectors**. v. 6, p. 348, 2013.

SILAGHI, C.; SANTOS, A.S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I.A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; VON LOEWENICH, F.D.; OTEO, J.A.; DE LA FUENTE, J.; DUMLER, J.S. Guidelines for the Direct Detection of Anaplasma spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v. 17, n. 1, p. 12-22. 2017.

DA SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.; PECKLE, M.; DA COSTA, R.L.; VITARI, G.L.; SANTOS, L.A.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. A new quantitative PCR method for the detection of Anaplasma platys in dogs based on the citrate synthase gene. **J Vet Diagn Invest**. v. 28, n. 5, p. 529-535, 2016.

SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; LIMA, P.C.; CHAVES, B.N.; RIBEIRO, M.F. Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 23, p. 206-15, 2014.

SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.; RIBEIRO, M.F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 59, p. 353-360, 2012.

SILVEIRA, J.A.; VALENTE, P.C.; PAES, P.R.; VASCONCELOS, A.V.; SILVESTRE, B.T.; RIBEIRO, M.F. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 15, p. 877-959, 2015.

SILVEIRA, J.A.G.; RABELO, E.M.L.; LIMA, P.C.S.; CHAVES, B.N.; RIBEIRO, M.F.B. *Post-mortem* hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 23, p. 206-215, 2014.

SPONCHIADO, J.; MELO, G.L.; MARTINS, T.F.; KRAWCZAK, F.S.; JACINAVICIUS, F.C.; LABRUNA M.B.; BARROS-BATTESTI, D.M.; CÁCERES, N.C. Ectoparasites of small-mammals: determinants of community structure in South American savannah. **Parasitology**. v. 8, p. 1-9, 2016.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Systematic Biology**. v. 57, p. 758-771, 2008.

STEPHENSON, N.; HODZIC, E.; MAPES, S.; REJMANEK, D.; FOLEY, J. A real-time PCR assay for differentiating pathogenic Anaplasma phagocytophilum from an

apathogenic, woodrat-adapted genospecies from North America. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 6, p. 774–778, 2015.

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

SVITÁLKOVÁ, Z.; HARUŠTIAKOVÁ, D.; MAHRÍKOVÁ, L.; BERTHOVÁ, L.; SLOVÁK, M.; KOCIANOVÁ, E.; KAZIMÍROVÁ, M. Anaplasma phagocytophilum prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. **Parasites and Vectors**. 17;8:276, 2015.

SZEKERES, S.; COIPAN, E.C.; RIGÓ, K.; MAJOROS, G.; JAHFARI, S.; SPRONG, H.; FÖLDVÁRI, G. Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in natural rodent and tick communities in Southern Hungary. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 6, p. 111-116, 2014.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403–410, 1994.

VIEIRA, R.F.C.; VIEIRA, T.S.W.J.; NASCIMENTO, D.A.G.; MARTINS, T.F.; KRAWCZAK, F.S.; LABRUNA, M.B.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. Serological survey of *Ehrlichia s*pecies in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. **Revista do Institudo de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 55, p. 335-340, 2013.

VON WISSMANN, B.; HAUTMANN, W.; SING, A.; HIZO-TEUFEL, C.; FINGERLE, V. Assessing the risk of human granulocytic anaplasmosis and lyme borreliosis after a tick bite in Bavaria, Germany. **Internation Journal of Medical Microbiology**: IJMM, v. 305, n. 7, p. 736-741, 2015.

WALKER, D.H.; ISMAIL, N.; OLANO, J.P.; MCBRIDE, J.W.; YU, X.J.; FENG, H.M. Ehrlichia chaffeensis: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen. **Trans Am Clin Climatol Assoc**. v. 115, p. 375-82, 2004.

WEIL, A.A.; BARON, E.L.; BROWN, C.M.; DRAPKIN, M.S. Clinical findings and diagnosis in human granulocytic anaplasmosis: a case series from Massachusetts. **Mayo Clinical Proceedings**, v. 87, n. 3, p. 233-239, 2012.

WELC-FALĘCIAK, R.; KOWALEC, M.; ZAJKOWSKA, J.; PANCEWICZ, S.A.; SIŃSKI, E. Clinical and molecular features of one case of human infection with *Anaplasma phagocytophilum* from Podlaskie Province in eastern Poland. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 22, n. 3, p. 414-417, 2015.

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

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Parasitology**. v. 167, p. 108–122, 2010.

WOLF, R.W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEALD, S.; PINTO, L.B.; MELO, A.L.T.; BRAGA, I.A.; COSTA, J.S.; MARTINS, T.F.; MARCILI, A.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases** v. 7, p. 449-453, 2016.