

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis*
E *Babesia canis* EM FELÍDEOS SELVAGENS BRASILEIROS
MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Marcos Rogério André

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis*
E *Babesia canis* EM FELÍDEOS SELVAGENS BRASILEIROS
MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Marcos Rogério André

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO

Fevereiro de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ – solteiro, nascido na cidade de Sertãozinho, São Paulo, em 4 de fevereiro de 1982. É Médico Veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, em 2004. Durante o curso de graduação foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq, trabalhando com pesquisas na área de Imunoparasitologia. Recebeu o “Prêmio Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal”, por ter obtido a maior média entre as disciplinas ministradas durante o curso de Medicina Veterinária, “Prêmio Mário D’ Ápice”, outorgado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo, ao formando em Medicina Veterinária, melhor classificado no conjunto de disciplinas profissionalizantes e o “Prêmio Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo 1º Colocado no Curso de Medicina Veterinária 2004”. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal – SP, em março de 2006, sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivo Específico.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Animais experimentais.....	23
4.1.1. Espécies amostradas e áreas de estudo.....	23
4.2. Colheita das amostras.....	23
4.2.1. Imobilizações física e química.....	23
4.2.2. Obtenção das amostras de sangue e soro.....	25
4.3. Confecção de esfregaços sangüíneos.....	25
4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	26
4.4.1. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de <i>Ehrlichia</i> <i>canis</i>	26
4.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia</i> <i>canis</i>	26
4.4.3. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de <i>Babesia</i> <i>canis</i>	28
4.4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia canis</i>	29
4.5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	31
4.5.1. Extração de DNA de sangue total.....	31
4.5.2. Amplificação do DNA do gênero <i>Ehrlichia</i>	31
4.5.3. Amplificação do DNA da espécie <i>Ehrlichia canis</i>	31
4.5.4. Amplificação do DNA da espécie <i>Babesia canis</i>	32
4.5.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	32
4.6. Reação de Seqüenciamento.....	32
4.6.1. Extração dos Amplímeros do Gel de Agarose.....	32
4.6.2. Quantificação de DNA dos amplímeros.....	33
4.6.3. Reação de Seqüenciamento.....	33
4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	34
4.7.1. Análise dos produtos seqüenciados.....	34
5. RESULTADOS.....	35

5.1. Esfregaços sangüíneos a partir de punção de ponta de orelha.....	35
5.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	35
5.2.1. Soropositividade para <i>Babesia canis</i>	35
5.2.2. Soropositividade para <i>Ehrlichia canis</i>	35
5.2.3. Co-soropositividade e co-soronegatividade para <i>B. canis</i> e <i>E. canis</i>	38
5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	39
5.3.1. PCR para <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i>	39
5.3.2. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para <i>E. canis</i>	40
5.4. Análise das similaridades de seqüências obtidas pelo BLAST.....	41
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	51
8. REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número, espécies e instituições de origem dos felídeos selvagens brasileiros amostrados.....	24
Tabela 2. Dosagens anestésicas utilizadas para a imobilização química de felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro.....	25
Tabela 3. Número de felinos neotropicais soropositivos frente ao antígeno de <i>Babesia canis</i> e <i>Ehrlichia canis</i> , de acordo com a espécie animal e instituição de origem.....	36
Tabela 4. Número e porcentagem de felídeos sororeagentes aos antígenos de <i>B. canis</i> e <i>E. canis</i> de acordo com a espécie animal.....	37
Tabela 5. Co-soropositividade e co-soronegatividade dos felídeos amostrados frente aos antígenos de <i>E. canis</i> e <i>B. canis</i>	39
Tabela 6. Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para <i>E. canis</i> para os felídeos selvagens em cativeiro amostrados.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reação de Imunofluorescência Indireta para *Ehrlichia canis*. A: soro de felino controle positivo. B: soro de felino controle negativo. 27
Aumento de 1000X.....
- Figura 2. Reação de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis*. A: soro de felino controle positivo. B: soro de felino controle negativo 30
Aumento de 1000X.....
- Figura 3. Representação gráfica da distribuição dos felídeos neotropicais em cativeiro amostrados segundo o título de anticorpos para *B. canis* e *E. canis*..... 38
- Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *E. canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN/HE3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (396pb); Canaleta 2 até 3: amostradas de jaguatirica positivas; Canaleta 4: gato maracajá negativo; Canaleta 5 até 6: amostras positivas de jaguatirica; Canaleta 7 até 8: amostras positivas de gato-do-mato-pequeno; Canaleta 9: amostra positiva de puma; Canaleta 10: controle negativo; Canaleta 11: amostra positiva de onça-pintada..... 40

DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM FELÍDEOS SELVAGENS BRASILEIROS MANTIDOS EM CATIVEIRO

RESUMO - Poucos relatos têm sido feitos sobre o diagnóstico da erliquiose e babesiose em felinos domésticos e selvagens brasileiros, os quais são baseados diretamente pela presença de mórulas em leucócitos e piroplasmas em eritrócitos, e indiretamente pela detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*. O presente estudo teve como objetivo realizar a detecção molecular de *E. canis* e *B. canis* e a presença de anticorpos da classe IgG contra esses hemoparasitas em amostras de sangue e soro, respectivamente. Neste utilizamos 72 felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro em algumas instituições e zoológicos. Pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), dezoito (25%) e cinquenta e três (73,6%) dos 72 animais amostrados foram sororeagentes frente aos antígenos de *E. canis* e *B. canis*, respectivamente. Na PCR para *E. canis*, onze (15,3%) dos 72 animais amostrados foram positivos. Os amplicons foram confirmados por seqüenciamento e o DNA de *E. canis* encontrado mostrou grande similaridade genética com amostras de *E. canis* isoladas no Brasil, México, Portugal, Grécia e Taiwan, com 98% de similaridade. Nenhuma das amostras foi positiva na PCR para *B. canis*. Destaca-se a importância e a primeira detecção molecular de *E. canis* e presença de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis* em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro.

Palavras-chave: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, felídeos selvagens, PCR, sorologia

MOLECULAR AND SEROLOGICAL DETECTION OF *Ehrlichia canis* AND *Babesia canis* IN BRAZILIAN WILD CAPTIVE FELIDS

SUMMARY - Few are the reports that have been carried out on ehrlichiosis and babesiosis diagnostic in Brazilian domestic and wild felids, which are based directly on the presence of morulae in leucocytes and piroplasms in erythrocytes, and indirectly by detection of antibodies against *E. canis*. The aim of this study was to detect molecularly *E. canis* and *B. canis* and the presence of anti-*E. canis* and *B. canis* IgG antibodies in the blood and sera samples, respectively, from 72 Brazilian wild captive felids maintained in some institutions and zoos. Eighteen (25.0%) and fifty-three (73.6%) out of 72 animals were seroreagent for *E. canis* and *B. canis* antigen, respectively, by IFA (Indirect Immunofluorescent Assay). Eleven (15.3%) of the 72 samples were positive for nPCR *E. canis*. The amplicons were confirmed by sequencing and the *E. canis* DNA found appeared to be closely related to *E. canis* samples from Brazil, Mexico, Portugal, Greece and Taiwan with 98% percent identity. None of the 72 samples were positive for *B. canis* by PCR. This is the first molecular detection of *E. canis* and presence of seroreactivity for both *B. canis* and *E. canis* in Brazilian wild captive felids.

Keywords: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, wild felids, PCR, serology

1. INTRODUÇÃO

A emergência de doenças parasitárias transmitidas por vetores artrópodes representa novos desafios para a medicina humana e veterinária. Artrópodes e doenças transmitidas estão ampliando sua distribuição geográfica, devido principalmente a mudanças climáticas e acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais. A presença de animais domésticos em ambientes selvagens tem resultado em uma associação cada vez mais íntima entre reservatórios selvagens e vetores com o homem e animais domésticos. Tais fatos associados com o advento da biologia molecular, em particular o uso da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), resultaram em um aumento do reconhecimento de doenças transmitidas por artrópodes vetores.

Recentemente, diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar o possível papel dos animais selvagens na epidemiologia das doenças erliquiais. A identificação de reservatórios selvagens para hemoparasitas ajudaria no controle das enfermidades por eles causadas, principalmente aquelas de caráter zoonótico. A detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia chaffeensis* em cães no Estado de Minas Gerais, associada com a primeira detecção molecular do agente da erliquiose monocítica humana em cervos-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) ressaltam a necessidade de estudos mais aprofundados na epidemiologia dos vetores, reservatórios e agentes envolvidos nesta enfermidade, a fim de aumentar a efetividade do diagnóstico.

Em contrapartida, a literatura a respeito da erliquiose e babesiose em felídeos selvagens é escassa e, dessa forma, necessita de mais estudos. Pouco se sabe a respeito da epidemiologia da erliquiose em felídeos selvagens. Dentre os agentes erliquiais, *E. canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia risticii* podem parasitar felídeos domésticos e selvagens. A *E. canis*, agente mais comum e patogênico da erliquiose canina, infecta leucócitos mononucleares, formando inclusões citoplasmáticas chamadas mórulas. No Brasil, a primeira descrição de erliquiose em felinos domésticos foi realizada em 1998, cujos sinais clínico-laboratoriais são semelhantes aos da erliquiose canina.

O estudo da *E. canis* no laboratório de Imunoparasitologia da UNESP – Jaboticabal vem sendo realizado desde 1994, quando a amostra de *E. canis* foi isolada em um cão, fêmea, da raça Weimaraner, em fase aguda da doença por MACHADO¹ em 1993. CASTRO et al. (2004) avaliaram as alterações clínicas, imunológicas, hematológicas e anatomopatológicas durante a fase aguda da erliquiose em cães experimentalmente infectados. Posteriormente, realizou estudos da imunidade com caracterização da resposta imune celular (CASTRO, 2004). OLIVEIRA et al. (2000) detectaram 92,31% de soropositividade para *E. canis*, por meio do “Dot-ELISA”, dentre 48 cães naturalmente infectados. ORIÁ (2001) correlacionou as uveítes ao estudo da erliquiose canina e detectou presença de anticorpos anti-*E. canis* em humor aquoso, além de observar na histopatologia, alterações inflamatórias com infiltrado de células mononucleares mais acentuadas no limbo, corpo e processos ciliares. SILVA (2001), em exames histopatológicos realizados com Pastores Alemães infectados experimentalmente com a cepa mantida no Laboratório de Imunoparasitologia, observou alterações mielodisplásicas, além de alta reação monofagocitária na medula óssea. NAKAGHI et al. (2008, no prelo) realizaram um estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *E. canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose, verificando que a sorologia associada à nested PCR é a mais adequada no diagnóstico definitivo da doença. OLIVEIRA (2004) verificou ausência de reatividade cruzada entre *Leishmania chagasi*, *Babesia canis* e *E. canis* nos testes sorológicos de ELISA e Reação de Imunofluorescência Indireta. DAGNONE (2006) caracterizou molecularmente espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal – SP e Campo Grande – MS, confirmando por meio da PCR, seqüenciamento e análises filogenéticas, a presença de infecção por *E. canis* e *A. platys* em cães das regiões estudadas. FARIA (2006) realizou um estudo comparativo de detecção de DNA de *E. canis* em sangue total e em aspirado de baço pela nested PCR em cães naturalmente infectados, verificando maior sensibilidade do segundo

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

teste em relação ao primeiro. MACHADO et al. (2006) detectaram a presença de DNA de *Ehrlichia chaffeensis* em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*).

Em cães, é muito comum a infecção concomitante por *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*. A *B. canis* é um grande piroplasma (3-5 μm), com formato piriforme, e que geralmente ocorre aos pares dentro dos eritrócitos dos hospedeiros.

Grandes e pequenos piroplasmas têm sido reportados em felídeos domésticos e selvagens. Felídeos domésticos podem ser parasitados por *Babesia felis*, *B. cati*, *B. canis canis* e *B. canis presentii*. Já os felídeos selvagens podem ser parasitados por *B. felis*, *B. herpailuri*, *B. pantherae*, *B. leo* e por piroplasmas não identificados encontrados em chitas e pumas.

Animais selvagens podem apresentar manifestações clínicas de babesiose semelhantes às observadas em animais domésticos quando mantidos em cativeiro. Por outro lado, animais mantidos em cativeiro podem não ser expostos aos seus parasitos naturais e assim, não desenvolvem imunidade aos mesmos. Quando introduzidos na natureza com o objetivo de aumentar o número de indivíduos de populações diminuídas ou estabelecer novas populações, eles poderão sucumbir a tais parasitos. Infecção de animais selvagens mantidos em cativeiro com uma espécie de *Babesia* de animais domésticos pode ser fatal, uma vez que animais selvagens possuem suas próprias babesias, com variados graus de especificidade a hospedeiros e estabilidade endêmica geralmente previsível. Fatores estressantes, tais como captura e manutenção em cativeiro durante certo período de tempo, podem reagudizar uma babesiose clínica, causada por parasitas usualmente benignos para os animais selvagens.

Em relação à babesiose, são de real importância a detecção e identificação desses hemoparasitas dentre os animais selvagens, em função das similaridades morfológicas existentes dentre os piroplasmas e o potencial risco de introdução dessa doença em zoológicos devido ao transporte, importação e transferência desses animais.

Embora as implicações destas hemoparasitoses sobre a conservação dos felinos selvagens sejam difíceis de ser estimadas, o atual estudo se mostra valioso, uma vez que a maioria destas espécies de animais se encontra atualmente ameaçada de

extinção e, por este motivo, fazem parte de programas de reprodução em cativeiro no Brasil e no exterior.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Erliquiose em felinos domésticos e selvagens

Doenças transmitidas por vetores artrópodes são mundialmente importantes para a saúde humana e animal. Um grande número de agentes infecciosos, hospedeiros e vetores estão envolvidos com estas enfermidades e sua epidemiologia (HARRUS e BANETH, 2006). Pouco se sabe a respeito da epidemiologia da erliquiose em carnívoros selvagens, os quais podem servir como boas sentinelas para *Ehrlichia spp.*, já que além de serem hospedeiros para as erlíquias e para os carrapatos vetores, possuem uma maior área de abrangência territorial do que outros hospedeiros de carrapatos (FOLEY et al., 1999). Estudos de patogenicidade e tratamento da erliquiose têm sido explorados intensivamente, mas a epidemiologia desta doença se mantém, em muitas regiões, especulativa. Os possíveis hospedeiros para os agentes causadores da enfermidade e os ciclos naturais de transmissão ainda não foram totalmente estabelecidos (AMYX e HUXSOLL, 1973). Poucos relatos têm sido feitos a respeito da erliquiose em felinos (ALMOSNY e MASSARD, 1999) cujos sinais clínico-laboratoriais são semelhantes aos da erliquiose canina (ALMOSNY e MASSARD, 1999; BEAUFILS et al., 1995; BEAUFILS et al., 1999; BJOERSDORFF et al., 1999).

2.1.1. Agentes etiológicos

Erlíquias são bactérias gram-negativas, imóveis, intracelulares obrigatórias, cocóides a elipsoidais, residentes em fagossomos e que pertencem à Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae*, subdivisão α das Proteobactérias, que causam doenças no homem e animais (WALKER e DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003). São organismos que se mantêm na natureza através de interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (DUMLER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003). O gênero *Ehrlichia* compreende espécies filogeneticamente relacionadas, porém genética e antígenicamente diferentes (YU et al., 2006).

Dumler et al. (2001) propuseram uma reclassificação que divide os membros da ordem *Rickettsiales* em duas famílias: *Rickettsiaceae* (organismos que ocupam

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

Dentre os agentes erliquiais, *E. canis* (BREITSCHWERDT et al., 2002; YIN-CHIACHUN et al., 2003), *A. phagocytophilum* (BJOERSDORFF et al., 1999; FOLEY et al., 1999) e *N. risticii* (DAWSON et al., 1988) podem parasitar felídeos domésticos e selvagens.

2.1.2. Transmissão e Ciclo Biológico da *Ehrlichia canis*

A *Ehrlichia canis*, agente mais comum e patogênico da erliquiose canina, infecta leucócitos mononucleares, formando inclusões citoplasmáticas, chamadas mórulas. Estas inclusões, de aspecto compacto, são formadas por agrupados de pequenas estruturas que variam de forma cocóide a elipsoidal (RISTIC e HUXSOLL, 1984). Segundo NYINDO et al. (1971), o desenvolvimento das mórulas inicia-se num único corpúsculo elementar dentro do monócito, que se multiplica formando inclusões citoplasmáticas imaturas, denominados corpúsculos iniciais, os quais se desenvolvem após 7 a 12 dias de incubação, formando as mórulas. Neste estágio, muitos monócitos estão três a quatro vezes maiores que o seu tamanho original (NYINDO et al., 1971).

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

Em cães, o principal mecanismo de transmissão natural é através da saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* que, ao se alimentar, inocula a bactéria nos

animais susceptíveis (EWING, 1969). O carrapato se infecta ao ingerir sangue contendo a bactéria, que é capaz de se multiplicar nos hemócitos, nas células das glândulas salivares e do intestino (SMITH et al., 1976). A transmissão ocorre de forma transtestadial e não transovariana (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976). Embora se acredite que a erliquiose felina seja transmitida por carrapatos, o vetor ainda não foi identificado.

2.1.3. Detecção direta por meio de esfregaços sangüíneos

O uso de esfregaços citológicos a partir da camada leucocitária e linfonodos podem levar a um diagnóstico definitivo da erliquiose, em sua fase aguda. Mórulas devem ser diferenciadas de estruturas intra e extracelulares semelhantes a elas, a fim de evitar diagnósticos falso-positivos, tais como: plaquetas, material nuclear fagocitado em monócitos, grânulos azurófilos em linfócitos e corpos linfoglandulares (MYLONAKIS et al., 2003). A detecção direta por meio de esfregaços sangüíneos é uma técnica rápida e confirmatória, porém de baixa sensibilidade; além do baixo número de células com mórulas, a sensibilidade é afetada pela experiência do microscopista e pelo baixo número de esfregaços e células examinadas (PADDOCK e CHILDS, 2003; MYLONAKIS et al., 2003; PASSOS et al., 2005).

A primeira descrição da presença de mórulas em células sangüíneas mononucleares de felinos domésticos foi realizada na França, em 1986 (CHARPENTIER e GROULADE, 1986). Quando LEWIS JR. et al. (1975) inocularam experimentalmente felinos domésticos com *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophilum*), foram observadas mórulas em eosinófilos 7 a 8 dias pós- infecção.

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

BUORO et al. (1994) observaram em um leão adulto, em seu hábitat natural, a presença de carrapatos do gênero *Haemaphysalis*. O animal apresentava sintomatologia compatível com erliquiose e presença de mórulas características de

Ehrlichia spp. em monócitos sangüíneos e em células mononucleares em impressão órgãos.

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

No Brasil, ALMOSNY et al. (1998) observaram a presença de mórulas em leucócitos mono e polimorfonucleares em esfregaço sangüíneo de um felino doméstico com achados clínico-laboratoriais sugestivos de erliquiose felina (ALMOSNY et al., 1998).

BJOERSDORFF et al. (1999), na Suécia, encontraram mórulas no citoplasma de neutrófilos de um felino doméstico com sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com erliquiose granulocítica felina.

2.1.4. Diagnóstico sorológico

Embora os testes sorológicos sejam os mais freqüentemente utilizados para o diagnóstico da erliquiose, sabe-se que as várias espécies de erlíquias dividem antígenos em comum, gerando reações cruzadas. Dessa forma, são requeridas interpretação cuidadosa e correlação dos testes diagnósticos com achados clínicos e epidemiológicos para evitar designação incorreta do agente em questão. A sorologia pode resultar em resultados negativos durante a primeira semana de infecção (WALKER e DUMLER, 1996; WANER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003) e não distingue uma infecção corrente de uma exposição sem estabelecimento de infecção ou infecção prévia (SHAW et al., 2001). Existe ainda uma considerável variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos (SHAW et al., 2001). A PCR em combinação com a RIFI traz um diagnóstico rápido e coerente da erliquiose (IQBAL et al., 1994).

PERRY et al. (1989) encontraram uma soroprevalência de anticorpos anti-*N. risticii* de 16,6% em uma amostra de 48 felinos domésticos oriundos de fazendas nas quais a Febre do Rio Potomac (erliquiose monocítica eqüina) era considerada endêmica, na região de Maryland, Estados Unidos, indicando a necessidade de se estudar o possível papel dos felinos na epidemiologia desta enfermidade.

A partir de uma amostra de 17 felinos domésticos, BOULOY et al. (1994) encontraram uma soroprevalência de 82,4% e 52,9% para *E. canis* e *N. risticii*, respectivamente. Oito animais apresentaram anticorpos reagentes para ambos os antígenos (BOULOY et al., 1994).

MATTHEWMAN et al. (1996) detectaram anticorpos contra proteínas imunodominantes de *E. canis* através do “Western Blotting” em felinos domésticos da África do Sul e Zimbábue. Doze por cento (12%) dos animais analisados da África do Sul e um animal do Zimbábue apresentaram anticorpos contra uma proteína de 27kD de *E. canis*.

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

No Colorado, Estados Unidos, soros de 344 felinos domésticos foram coletados para pesquisa de anticorpos contra agentes erliquiais, durante um período de oito anos. Anticorpos que reagiram para aos antígenos de *E. canis* e/ou *N. risticii* foram detectados em 22,1% dos animais. Dos animais soropositivos, 13,2% foram positivos somente para *E. canis*, 64,5% somente para *N. risticii* e 22,4% para ambos os agentes erliquiais. Destes últimos, os títulos de anticorpos foram maiores para *E. canis* em seis animais; títulos de anticorpos anti-*N. risticii* mostraram-se maiores em cinco deles e, em seis gatos, os títulos de anticorpos foram iguais para os dois agentes em questão (STUBBS et al., 2000).

Em Madri, a partir de uma amostra de 122 felinos domésticos, AGUIRRE et al. (2004) verificaram que 10,6% eram soropositivos para *E. canis*, 2,4% para *N. risticii* e 4,9% para *A. phagocytophilum*. Dois animais soropositivos para *N. risticii* e um animal soropositivo para *A. phagocytophilum* foram também soropositivos para *E. canis*. Todas as amostras foram negativas na PCR (AGUIRRE et al., 2004). Em Barcelona, ORTUNO et al. (2005) detectaram anticorpos anti-*E. canis* em 17,9% de 235 felinos domésticos amostrados, sendo que a maioria dos animais apresentou baixo título de anticorpos.

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

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

Uma soroprevalência de aproximadamente 4% foi encontrada em lincês (*Lynx lynx*) da Suíça frente ao antígeno de *A. phagocytophilum*, sugerindo que estes animais são expostos ao agente da erliquiose granulocítica humana (RYSER-DIGIORGIS et al., 2005).

FILONI et al. (2006) detectaram alto título de anticorpos anti-*E. canis* (1:20480) em uma suçuarana brasileira (*Puma concolor*) de vida livre.

Uma amostra de 460 soros de felinos domésticos de várias regiões dos Estados Unidos foi avaliada quanto à presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum*. Vinte animais (4,3%) apresentaram-se soropositivos, entretanto negativos à PCR, demonstrando que a infecção natural por este agente erliquial em felinos domésticos é incomum (BILLETER et al., 2007).

2.1.5. Diagnóstico molecular

A nested PCR é altamente sensível, pois é capaz de detectar 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis*, enquanto que uma só amplificação de DNA permite detectar apenas valores acima de 20 pg (WEN et al., 1997). Após testar a nested PCR com primers baseados na seqüência do gene *16SrRNA* da *Ehrlichia spp.* na primeira amplificação e primers específicos para *E. canis* na segunda etapa, WEN et al. (1997) inferiram que a nested PCR é altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis* e que pode ser útil para o diagnóstico laboratorial e para a determinação da terapia antimicrobiana contra este agente (WEN et al., 1997; NAKAGHI et al., 2008 no prelo). A realização de uma PCR, amplificando DNA de todas as espécies de *Ehrlichia spp.*, seguida por seqüenciamento, é uma ferramenta útil para o estudo epidemiológico da infecção erliquial em carrapatos e vertebrados (INOKUMA et al., 2001). Sempre que possível, fragmentos amplificados pela PCR devem ser seqüenciados para confirmar a validade dos resultados da PCR quando o ensaio está sendo feito para diferenciar espécies de *Ehrlichia*, particularmente quando a PCR é aplicada a amostras derivadas de outros animais que não cães (HANCOCK et al., 2001; MASSUNG e SLATER, 2003).

BREITSCHWERDT et al. (2002) detectaram, pela primeira vez, DNA de *E. canis* em três felinos domésticos com manifestações clínicas de erliquiose, porém soronegativos frente ao antígeno de *E. canis*.

No Taiwan, YIN-CHIACHUN et al. (2003) detectaram DNA de *E. canis* pela nested PCR em dois de 17 felinos domésticos analisados (11,76%), os quais se apresentavam soronegativos e anêmicos.

BJOERSDORFF et al. (1999), na Suécia, descreveram o primeiro relato de erliquiose granulocítica felina (*A. phagocytophilum*), confirmado através da PCR e seqüenciamento. Na América do Norte, o primeiro relato de infecção por *A. phagocytophilum* em gatos foi feito por LAPPIN et al. (2004), confirmado através de sorologia e PCR positivos para este agente.

A presença de DNA de *A. phagocytophilum* foi detectada em oito pumas na Califórnia. Dos 47 animais analisados, 16% mostraram-se soropositivos frente ao antígeno de *A. phagocytophilum*. Dezenove por cento (19%) dos "pools" de carrapatos ingurgitados coletados desses animais foram positivos na PCR (FOLEY et al., 1999).

Em Barcelona, TABAR et al. (2007) encontraram um animal positivo na PCR para os gêneros *Ehrlichia/Anaplasma* entre cem felinos domésticos.

2.1.6. Sinais clínicos, laboratoriais e achados de necropsia

Felídeos infectados por *E. canis* apresentam febre, apatia, anorexia, perda de peso, palidez de mucosas, linfadenomegalia, esplenomegalia, anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, leucopenia, aumento da atividade sérica das transaminases e fosfatase alcalina e hiperglobulinemia (BUORO et al., 1989; BUORO et al., 1994; BOULOY et al., 1994; PEAVY et al., 1997; ALMOSNY et al., 1998; ALMOSNY e MASSARD, 1999; STUBBS et al., 2000; SHAW et al., 2001; BREITSCHWERDT et al., 2002). Gatos experimentalmente infectados por *N. risticii* apresentam diarréia intermitente, linfadenopatia, depressão aguda e anorexia entre 20 e 24 dias após inoculação (DAWSON et al., 1988). Já a infecção por *A. phagocytophilum* é caracterizada por hiperestesia, mialgias, artralguas, rigidez de pescoço, claudicação, incoordenação, neutrofilia com desvio a esquerda, linfopenia, além dos outros sinais clínico-laboratoriais comuns à erliquiose canina (BJOERSDORFF et al., 1999; TARELLO, 2005).

Poucos são os relatos de achados de necropsia em felinos portadores de erliquiose clínica. Sinais de caquexia, emaciação, diarreia, distúrbio congestivo hemorrágico, notavelmente nos pulmões, foram achados anátomo-patológicos em gatos jovens inoculados experimentalmente com *E. canis* (ALMOSNY e MASSARD, 2002). Observações a partir de biópsias de linfonodos mesentéricos revelaram um infiltrado inflamatório (neutrófilos e macrófagos), caracterizando uma linfadenite piogranulomatosa (BOULOY et al., 1994).

2.1.7. Tratamento

Da mesma forma que na erliquiose canina, tetraciclina e doxiciclina são drogas de escolha para as infecções erliquiais em felinos (BUORO et al., 1989; BOULOY et al., 1994; ALMOSNY et al., 1998; PEAVY et al., 1997; ALMOSNY e MASSARD, 1999; BJOERSDORFF et al., 1999; BREITSCHWERDT et al., 2002; LAPPIN et al., 2004; TARELLO et al., 2005).

2.1.8. Erliquiose humana

A erliquiose humana vem ganhando especial atenção como um problema de saúde pública e é causada por *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *N. sennetsu*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* (WALKER e DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001; UNVER et al., 2001; PADDOCK e CHILDS, 2003; TAMÍ e TAMÍ-MAURY, 2004; PAROLA et al., 2005; WORMSER et al., 2006). No Brasil, os primeiros casos suspeitos de erliquiose humana foram descritos no estado de Minas Gerais, por meio de sintomatologia clínica compatível e sorologia positiva para *E. chaffeensis* (CALIC et al., 2004; COSTA et al., 2005; COSTA et al., 2006).

2.2. Babesiose em felinos domésticos e selvagens

A babesiose, causada pela infecção de protozoários parasitas apicomplexos intra-eritrocíticos pertencentes ao gênero *Babesia*, é uma das infecções mais comuns de animais de vida livre em todo o mundo. Embora capaz de infectar uma grande variedade de vertebrados, as babesias requerem hospedeiros vertebrados e invertebrados para a manutenção do seu ciclo de transmissão. Os parasitas replicam-se

nas hemácias dos hospedeiros vertebrados e são chamadas de piroplasmas devido à sua aparência de dupla pêra (HOMER et al., 2000).

2.2.1. Agentes etiológicos

Grandes e pequenos piroplasmas têm sido reportados em vários felídeos selvagens e domésticos (PENZHORN, 2006; UILEMBERG, 2006). Frequentemente, os relatos são uma mera documentação de organismos vistos em esfregaços sangüíneos realizados randomicamente em animais sadios e, em uma minoria de casos, são incriminados como agentes causadores de doenças em seus hospedeiros. A nomenclatura e descrição dos hematozoários são inadequadas aos padrões atuais e a maioria dos parasitos tem sido nomeada de acordo com seu hospedeiro (UILEMBERG, 2006). Em contraste com essas descrições informais do passado, a definição e identificação atual de espécies têm se tornado muito mais rigorosas, sendo suportada principalmente por caracterizações moleculares (PENZHORN, 2006), uma vez que a mera evidência sorológica também seja insuficiente (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999).

Felídeos domésticos podem ser parasitados por *Babesia felis* (DAVIS, 1929), *B. cati* (MUDALIAR et al., 1950), *B. canis canis* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003) e *B. canis presentii* (BANETH et al., 2004). Já os felídeos selvagens podem ser parasitados por *B. felis* (DAVIS, 1929), *B. herpailuri* (DENNIG, 1967), *B. pantherae* (DENNIG e BROCKLESBY, 1972), *B. leo* (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999; PENZHORN et al., 2001) e por piroplasmas não identificados encontrados em chitas (*Acinonyx jubatus*) (AVERBECK et al., 1990) e pumas (YABSLEY et al., 2006).

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

Baseado em análises moleculares, os piroplasmas são classificados em quatro grandes grupos: 1) *Babesia sensu stricto* (as “verdadeiras” babesias); 2) *Theileria* e *Cytauxzoon*; 3) piroplasmas de humanos e de animais selvagens; e 4) *B. microti* e pequenas babesias (KJEMTRUP et al., 2000). As duas subespécies de *B. canis* encontradas em felinos domésticos são colocadas no grupo das verdadeiras babesias

(grupo 1) (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; BANETH et al., 2004). Já os piroplasmas de felídeos africanos (*B. leo* e *B. felis*) e a espécie relacionada à *B. microti* (referida como *T. annae*) encontrada em Portugal, são inclusas no grupo das pequenas babesias/ *B. microti* (PENZHORN et al., 2001). A relação filogenética entre *B. pantherae* e *B. herpailuri* com outros piroplasmas ainda é desconhecida (YABSLEY et al., 2006).

2.2.2. Babesia canis

Em cães, é muito comum a infecção concomitante por *E. canis* e *B. canis* (TROY e FORRESTER, 1990; TABOADA, 1998). A babesiose canina, uma doença hemolítica com distribuição mundial e com significância global, é causada por grandes piroplasmas descritos como *B. canis* e por pequenos parasitas agrupados sob a denominação de *B. gibsoni* (BOOZER e MACINTIRE, 2003).

A *Babesia canis* é um grande piroplasma (3-5 µm), com formato piriforme e que geralmente ocorre aos pares dentro dos eritrócitos dos hospedeiros (LOBETTI, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003). Três subespécies de *B. canis* têm sido descritas com base em diferenças nas síndromes clínica e patológica causadas por cada subespécie, propriedades antigênicas, transmissão por diferentes carrapatos vetores e caracterização genética. *Babesia canis rossi*, descrita na África do Sul, é transmitida pelo carrapato *Haemaphysalis leachi* e causa uma doença hemolítica severa e freqüentemente fatal em cães. *Babesia canis vogeli* é encontrada no Oriente Médio, Norte da África, Europa, Ásia, Austrália e América do Sul e é transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus*, induzindo normalmente uma doença de sinais clínicos moderados em cães. *Babesia canis canis*, descrita na Europa, é transmitida pelo carrapato *Dermacentor reticulatus* e causa anemia hemolítica com variados graus de severidade e anormalidades da coagulação (UILENBERG et al., 1989; ZAHLER et al., 1998; CARRET et al., 1999; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005). No Brasil, confirmou-se molecularmente que cães podem ser parasitados por *B. canis vogeli* (FURUTA, 2004; PASSOS et al., 2005) e *B. gibsoni* (TRAPP et al., 2006).

2.2.3. Ciclo Biológico da Babesia canis

Em cães, a *Babesia canis*, assim como a *Ehrlichia canis*, é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é considerado reservatório para *B. canis*

vogeli, mas não para *E. canis*. A presença de cães infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos já que não ocorre transmissão vertical nestes artrópodes (NEER, 1998). *B. canis vogeli*, entretanto, pode ser transmitida por via transovariana e ser passada para a próxima geração de carrapatos na ausência de cães infectados (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003). Embora se acredite que a babesiose felina seja transmitida por carrapatos, o vetor ainda não foi identificado (PENZHORN et al., 2004).

No momento do repasto sangüíneo, o carrapato infectado inocula no cão, esporozoítas presentes nas glândulas salivares. Estes se aderem à membrana do eritrócito e, por endocitose, penetram na hemácia multiplicando-se por divisão binária, resultando na formação de merozoítas. Podem-se encontrar hemácias com até dezesseis merozoítas, mas o mais comum é que se observe um ou um par dos mesmos. Para que outras hemácias sejam parasitadas, os merozoítas deixam as células hospedeiras, encontrando-se livres na corrente sangüínea, por um curto período, e invadem outros eritrócitos (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998). Ao ingerir o sangue de um cão parasitado, o carrapato infecta-se com eritrócitos contendo diferentes estágios evolutivos da *B. canis*. Nas células intestinais do carrapato, as formas não assexuadas se degeneram, e os gametócitos transformam-se em gametas e, então, em corpos raiados. Após a fusão dos gametas masculino e feminino, os zigotos assim formados se transformam em cinetos móveis. Essas formas evolutivas atravessam a parede intestinal, caem na cavidade geral do artrópode e, por esporogonia, transformam-se em esporocinetos, infectando vários órgãos do carrapato, incluindo as glândulas salivares e ovários. A esporogonia continua nas glândulas salivares e nas larvas oriundas de ovos infectados, dando origem a milhares de esporozoítas, que serão transmitidos a outros hospedeiros por ocasião do repasto sangüíneo (KAKOMA e MEHLHORN, 1994; BORDEAU e GUELFY, 1995; TABOADA, 1998; MARQUARDT et al., 2000).

2.2.4. Detecção direta por meio de esfregaços sangüíneos

A detecção direta de *Babesia sp.* é feita pela visualização de merozoítas nos esfregaços sangüíneos corados com Giemsa, Romanowsky, Field's e Wright's modificado. São técnicas altamente específicas, pois permitem a visualização do

parasita, porém são de baixa sensibilidade, já que a parasitemia é variável, impossibilitando, ocasionalmente, a detecção de eritrócitos parasitados, mesmo porque a não detecção da *Babesia spp.* em esfregaços sangüíneos não implica na ausência da infecção. A sensibilidade da técnica pode ser aumentada com a confecção de esfregaços sangüíneos a partir de punção de capilares de ponta de orelha (KAKOMA e MEHLHORN, 1994; LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005).

DAVIS (1929) descreveu, pela primeira vez, a presença de um pequeno piroplasma, nomeado *Babesia felis*, parasitando um gato selvagem africano (*Felis silvestris*) do Sudão. O parasita foi então transmitido a felinos domésticos, embora não tenha causado doença clínica (DAVIS, 1929). Posteriormente, o mesmo agente foi incriminado como o agente causador de um quadro clínico severo em felinos domésticos na África do Sul (FUTTER e BELONJE, 1980a).

Babesia cati, um grande piroplasma gerando baixa parasitemia quando comparado à *B. felis*, foi isolado de felinos domésticos na Índia (MUDALIAR et al., 1950).

Babesia herpailuri, uma grande babesia, foi isolada de um gato-mourisco sul americano (*Herpailurus yagouaroundi*) (DENNIG, 1967).

Uma *Babesia* não identificada, com formas simples, pareadas ou agrupadas, geralmente com ângulos agudos, foi observada em esfregaços sangüíneos de um gato do Zimbábue com anemia. A morfologia do referido parasita aproximou-se, dentre todas as demais espécies de *Babesia* encontradas em felídeos, com a de *B. herpailuri* (STEWART et al., 1980).

Averbeck et al. (1990) encontraram um piroplasma morfologicamente semelhante à *Theileria felis* em 123 leões e oito chitas da Tanzânia.

Um pequeno piroplasma foi detectado em esfregaços sangüíneos de 47 leões (*Panthera leo*) da África do Sul, cujos soros foram negativos frente ao antígeno de *Babesia felis*. A partir do sangue desses animais, reproduziu-se a infecção em um leão, em um gato e um leopardo, sendo que nos dois últimos foram encontrados piroplasmas nos esfregaços sangüíneos. Os autores acreditaram tratar-se de uma nova espécie de *Babesia*, morfologicamente similar a *B. felis* e *C. felis*, mas antigenicamente distinta

(LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999). PENZHORN et al. (2001), através de análises filogenéticas, nomearam de *Babesia leo* este novo piroplasma isolado dos leões.

Parasitemia com uma grande espécie de *Babesia*, nomeada *B. canis subesp. presentii*, foi identificada em dois felinos domésticos de Israel. Ao contrário das outras subespécies de *B. canis*, o novo agente identificado possuía merozoítos e trofozoítos de pequeno tamanho (BANETH et al., 2004).

No Brasil, a primeira descrição de piroplasmas intra-eritrocíticos em felídeos foi realizada por MENDES-DE-ALMEIDA et al. (2004) em uma colônia urbana de felinos domésticos (*Felis catus*) de um zoológico do Rio de Janeiro, em que se observou a presença de piroplasmas indistinguíveis entre *Cytauxzoon spp.* e *Babesia spp.* em 47% dos animais. No Rio de Janeiro, GAZETA et al. (2004), constataram a presença de parasitas intra-eritrocíticos pleomórficos, em forma de dímeros, tétrades ou corpos únicos em esfregaços sangüíneos de uma fêmea de *Felis catus*. O parasita em questão, diferiu morfometricamente de *B. felis*, *B. leo*, *B. pantherae* e *B. herpailuri*, representando provavelmente uma nova espécie de *Babesia*. Em Pernambuco, DANTAS-TORRES e FIGUEREDO (2006) encontraram inclusões intra-eritrocíticas pequenas e pleomórficas, com formato de manchas arredondadas em felinos domésticos, semelhantes àquelas observadas por GAZETA et al. (2004).

2.2.5. Diagnóstico sorológico

A dificuldade em se detectar o parasita em infecção recente ou na fase crônica da babesiose conduz à pesquisa de anticorpos por meio de métodos sorológicos. As técnicas usualmente empregadas são a Reação de Imunofluorescência Indireta e o Ensaio Imunoenzimático Indireto (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1999; BOOZER e MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005).

Estudos soropidemiológicos para *Babesia sp.* em felinos domésticos e selvagens são escassos. A partir de uma amostra de 18 felinos domésticos de Kaapschehoop, África do Sul, PENZHORN et al. (1999) encontraram 11 animais soropositivos frente ao antígeno de *B. felis*, sendo que três desses animais apresentaram títulos de anticorpos maiores que 1:1280.

2.2.6. Diagnóstico molecular

A biologia molecular é uma técnica valiosa para o estudo da babesiose em animais selvagens. Um estudo acurado da epidemiologia da babesiose dentre a fauna silvestre deve englobar não somente a detecção molecular, mas também morfologia dos parasitos, interação hospedeiro-parasita e fatores biológicos. Árvores filogenéticas são construídas com base nas *Babesia spp.* de animais domésticos, com algumas espécies obtidas a partir de animais selvagens. Não há dúvida de que estas babesias representam somente a ponta do iceberg, e que as relações filogenéticas tornar-se-ão mais claras a partir do momento que as babesias obtidas a partir de animais selvagens forem adicionadas (PENZHORN, 2006). CRIADO-FORNELIO et al. (2004) salientam a necessidade de uma ampla busca seguida de análise molecular dos isolados de piroplasmas em diferentes localidades geográficas, o que seria relevante para a Medicina Veterinária uma vez que isto poderia ajudar a explicar falhas imunodiagnósticas e terapêuticas decorrentes do alto grau de diversidade genética dentro do grupo dos piroplasmas.

A presença de *Babesia* e *Theileria spp.* foi estudada em 13 felinos domésticos da Espanha e três de Portugal, dentre os quais 10 apresentavam infecção viral imunossupressiva (FeLV ou FIV), cinco eram assintomáticos e um animal apresentava sintomas compatíveis com babesiose. Felinos domésticos assintomáticos foram todos negativos na PCR. Seqüenciamento parcial do gene *18S rRNA* demonstrou que o animal com sintomatologia de babesiose estava infectado com *Babesia canis canis*, enquanto que três (30%) dos felinos domésticos com doença viral imunossupressora estavam co-infectados com piroplasmas (um com *B. canis canis*, um com *Theileria annae* e um com *B. canis canis* e *Theileria annae*) (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

BANETH et al. (2004) detectaram DNA de *B. canis presentii* em dois felinos domésticos de Israel, com achados clínico-laboratoriais compatíveis com babesiose felina e parasitados por carrapatos.

YABSLEY et al. (2006) utilizaram uma nested PCR baseada na porção *18SrRNA* para detectar DNA de piroplasmas em 41 pumas da Flórida (*P. concolor coryi*) e duas do Texas (*P. concolor stanleyana*). Trinta e dois animais mostraram-se positivos para *Babesia spp.* O fragmento de DNA amplificado encontrado apresentou similaridade genética com uma amostra de *Babesia sp.* detectada em carrapatos da espécie *Ixodes*

ovatus no Japão, *B. odocoilei* e *B. divergens*. A infectividade e patogenicidade desta *Babesia* sp. para felinos domésticos é desconhecida (YABSLEY et al., 2006).

BOSMAN et al. (2006), através da técnica de hibridização reversa (RLB, “Reverse Line Blot”), mostrou que *B. felis* e *B. leo* ocorrem como infecções únicas ou mistas em várias espécies de felídeos, porém mais freqüentemente em felinos domésticos e leões, respectivamente. Ainda neste estudo, um grande número de amostras testadas mostrou-se positiva apenas para o gênero *Babesia*, mas não para *B. felis* ou *B. leo*, levando a suposição de que existam mais espécies de *Babesia* que possam parasitar os felídeos.

2.2.7. Sinais clínicos, laboratoriais e achados de necropsia

A babesiose felina tem sido reportada esporadicamente em vários países, mas não parece ser uma doença com significado clínico que ocorra regularmente quando comparada àqueles casos verificados na África do Sul (PENZHORN et al., 2004). É freqüentemente caracterizada por anorexia, letargia, palidez de mucosas e perda de peso (FUTTER e BELONJE, 1980b; BREITSCHWERDT, 1990; SCHOEMAN et al., 2001; SHAW et al., 2001; PENZHORN et al., 2006). Anemia regenerativa macrocítica e hipocrômica (resultante de hemólises intra e extravascular ou imunomediada), presença de eritrócitos nucleados, reticulócitos, marcada anisocitose, policromasia, eritrofagocitose e corpúsculos de Howell-Jolly são achados comuns na babesiose felina (FUTTER et al., 1980; JACOBSON et al., 2000; SCHOEMAN et al., 2001; PENZHORN et al., 2006). As principais alterações clínico-patológicas são elevação da alanina aminotransferase e da concentração de bilirrubina total e hiperglobulinemia. Em contraste com a babesiose em cães, a babesiose felina não está freqüentemente associada com febre, icterícia, trombocitopenia e dano renal (FUTTER et al., 1981; SCHOEMAN et al., 2001; PENZHORN et al., 2006).

Os achados anatomopatológicos mais freqüentemente encontrados em felinos com babesiose são extrema palidez de vísceras e sangue aquoso. Icterícia é raramente acentuada. O fígado freqüentemente está aumentado de tamanho, com coloração amarelada ou amarronzada e, em alguns casos, a superfície apresenta um aspecto mosqueado. A vesícula biliar pode estar distendida. O trato intestinal geralmente apresenta conteúdo biliar espesso de coloração amarelada ou amarronzada, com um

conteúdo retal invariavelmente amarelo a alaranjado. Urina, quando presente, com coloração amarela ouro. A carcaça usualmente não se encontra emaciada. Linfonodos mesentéricos de tamanho aumentado são ocasionalmente vistos (FUTTER et al., 1981; PENZHORN et al., 2006). Graus variados de necrose hepática centrolobular, estase biliar, hematopoiese extramedular e deposição de hemossiderina são achados histopatológicos encontrados na babesiose felina (FUTTER et al., 1981).

2.2.8. Tratamento

Embora tenham sido observadas a ocorrência de carreadores crônicos da infecção e reagudização de casos após o tratamento convencional, fosfato de primaquina na concentração de 0,5 mg/kg ainda é a droga de escolha no tratamento da babesiose felina, sendo requerida muitas vezes repetição da terapia por longo período. (POTGIETER, 1981; JACOBSON et al., 2000; PENZHORN et al., 2000; PENZHORN et al., 2006). Doxiciclina pode apresentar benefícios potenciais no tratamento desta doença (PENZHORN et al., 2006).

Co-infecções com *Mycoplasma haemofelis*, vírus da leucemia felina e /ou vírus da imunodeficiência felina têm sido identificadas em um grande número de felinos domésticos, o que parece ter forte efeito na resposta ao tratamento e sobrevivência em animais com babesiose (JACOBSON et al., 2000; SCHOEMAN et al., 2001; SHAW et al., 2001; PENZHORN et al., 2004; PENZHORN et al., 2006). Embora a resposta à terapia seja geralmente boa e a premunição seja mantida ao longo do tempo, a taxa de mortalidade média para a babesiose felina é de aproximadamente 15% (JACOBSON et al., 2000; PENZHORN et al., 2004; PENZHORN et al., 2006).

2.2.9. Babesiose humana

A babesiose humana é uma enfermidade transmitida por carrapatos de caráter emergente. Na América do Norte, é causada pela *B. microti*, um parasita de roedores, e por uma espécie reconhecida recentemente chamada de piroplasma WA-1. Na Europa, a babesiose humana é mais rara, porém mais letal, causada pela *B. divergens*, parasita de bovinos (HOMER et al., 2000; KJEMTRUP e CONRAD, 2000; MELIANI et al., 2006; WORMSER et al., 2006). MARSAUDON et al. (1995) relatam um caso de infecção por *B. canis vogeli* em um paciente esplenectomizado com insuficiência renal aguda. O

primeiro caso de babesiose humana no Brasil foi relatado por ALECRIM et al. (1983), em um paciente com sintomatologia compatível e presença de estruturas características de *Babesia sp.* em esfregaços sangüíneos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de infecção por *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a detecção direta dos hemoparasitas por meio de esfregaços sangüíneos e da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR);
- Avaliar a frequência de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Comparar os resultados obtidos na detecção direta e indireta no diagnóstico das hemoparasitoses;
- Seqüenciar as amostras positivas da PCR e compará-las com seqüências depositadas no GenBankTM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa BLAST.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

4.1.1. Espécies amostradas e áreas de estudo

Foram amostrados 72 felídeos neotropicais mantidos em cativeiro (Licença IBAMA número 02027.002943/2005) das seguintes espécies: *Puma concolor* (suçuarana), *Leopardus pardalis* (jaguatirica), *Puma yagouaroundi* (gato-mourisco), *Leopardus wiedii* (gato-maracajá), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno), *Oncifelis colocolo* (gato-palheiro) e *Panthera onca* (onça-pintada). As colheitas foram realizadas na Associação Mata Ciliar (AMC - Jundiaí – SP), Zoológico Municipal Bosque dos Jequitibás de Campinas, Bosque/Zoológico Municipal de Pedreira, Bosque Municipal Fábio Barreto de Ribeirão Preto e Zoológico de Brasília (**Tabela 1**). Recentemente, a Associação Mata Ciliar foi reconhecida como Centro Brasileiro para Conservação de Felinos Neotropicais, ficando assim responsável pela coordenação do manejo e reprodução de todos os felinos brasileiros em cativeiro do Brasil.

4.2. Colheita das amostras

4.2.1. Imobilizações física e química

A fim de minimizar o estresse no momento da contenção, foram realizadas imobilizações de natureza física e química, de acordo com a idade, tamanho e espécie do animal. Os materiais usados para a contenção física foram luvas de couro, puçás e jaula de prensa. Para a contenção farmacológica, foram utilizados Cloridrato de Quetamina (Cetamin – Laboratórios Calier®) associado ao Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratórios Calier®), de acordo com o protocolo utilizado pela Associação Mata Ciliar (**Tabela 2**).

Tabela 1. Número, espécies e respectivas instituições de origem dos felídeos selvagens amostrados.

ESPÉCIE	NOME COMUM	ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR DE JUNDIAÍ	ZOOLOGICO DE PEDREIRA	ZOOLOGICO DE CAMPINAS	ZOOLOGICO DE RIBEIRÃO PRETO	ZOOLOGICO DE BRASÍLIA	NÚMERO DE ESPÉCIMES
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	24	0	0	2	3	29
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	8	0	1	2	3	14
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato-maracajá	2	0	0	0	0	2
<i>Oncifelis colocolo</i>	Gato-palheiro	3	0	0	0	0	3
<i>Panthera onca</i>	Onça-pintada	1	4	1	2	1	9
<i>Puma concolor</i>	Suçuarana	3	2	0	1	3	9
<i>Puma yagouaroundi</i>	Gato-mourisco	6	0	0	0	0	6
TOTAL		47	6	2	7	10	72

Tabela 2. Dosagens anestésicas utilizadas para a imobilização química de felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro.

ESPÉCIE DE FELÍDEO NEOTROPICAL	DROGAS E DOSES (mg/kg) *
<i>Leopardus tigrinus</i> , <i>Leopardus wiedii</i> , <i>Oncifelis colocolo</i> , <i>Puma yagouaroundi</i>	Cloridrato de quetamina (10) + Cloridrato de xilazina (2)
<i>Leopardus pardalis</i>	Cloridrato de quetamina (12) + Cloridrato de xilazina (1)
<i>Panthera onca</i> , <i>Puma concolor</i>	Cloridrato de quetamina (10) + Cloridrato de xilazina (1)

***Fonte:** Associação Mata Ciliar, Jundiaí, SP. 2006

4.2.2. Obtenção das amostras de sangue e soro

Para a obtenção de sangue, os animais de portes médio e pequeno foram contidos primeiramente com o auxílio de puçás e em seguida colocados em caixas de contenção/prensa para facilitar o manejo e posterior contenção farmacológica. Para a contenção farmacológica de felinos de grande porte (onça-pintada e suçuarana), foram utilizados dardos em zarabatanas contendo a preparação anestésica. A colheita foi realizada por meio de venopunção, utilizando-se agulhas e seringas estéreis. A veia de escolha para colheita bem como a quantidade de sangue a ser colhido e tamanho da agulha variou de acordo com a espécie, idade e massa corporal do animal. Parte do sangue foi depositado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e a outra parte em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. As amostras de sangue e soro foram alíquotizadas em microtubos de 1,5 mL estéreis e mantidos a -20°C, para posterior uso nos experimentos com a PCR e RIFI, respectivamente.

4.3. Confecção de esfregaços sangüíneos

Colheu-se sangue periférico a partir da punção de capilar marginal de ponta de orelha dos animais para confecção de esfregaços sangüíneos finos, os quais foram

fixados pelo Metanol (Synth®) durante 3 minutos e corados pela técnica de Giemsa (Sigma®) durante 30 minutos. A presença de corpúsculos de inclusão ou de mórulas sugestivos de *Ehrlichia spp.* nos leucócitos e piroplasmas característicos de *Babesia spp.* em hemácias foram avaliados sob microscopia de luz (x1000).

4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

4.4.1. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de *Ehrlichia canis*

O antígeno de *E. canis* usado para confecção de lâminas de RIFI foi obtido a partir de cultura de células DH82 (derivadas de histiocitoma canino) infectadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, isolada por MACHADO² em 1993 a partir de um cão, fêmea, da raça Weimaraner, em fase aguda da doença (AGUIAR et al., 2007).

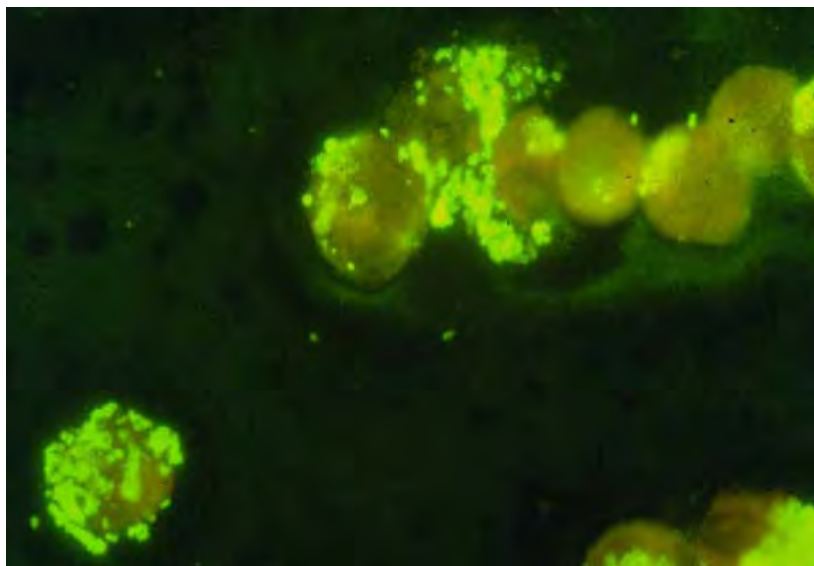
4.4.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis*

As amostras de soro foram diluídas a 1:20 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na₂HPO₄; 10 mM KH₂PO₄; 9,2 mM NaH₂PO₄). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço da lâmina com antígeno de *E. canis*, reservando-se dois poços para a adição das amostras de soros controle positivo e negativo. Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos frente ao antígeno de *E. canis*. O procedimento foi o mesmo para cada lâmina a ser testada. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida.

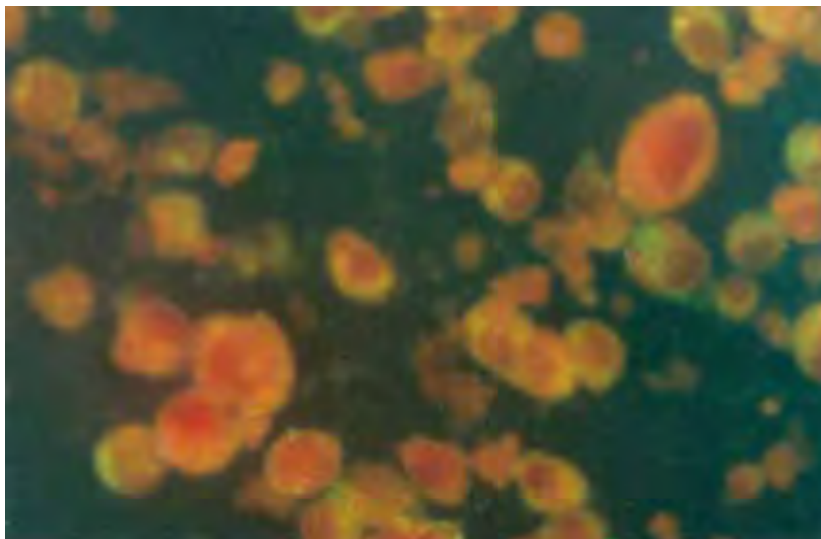
Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (1,37 M NaCl; 26,82 mM KCl; 101,44 mM Na₂HPO₄; 17,63 mM KH₂PO₄), secas e a cada poço adicionados 10 µL de conjugado (anti-IgG de gato, marcado pelo isotocianato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão para os controles positivo e negativo), diluído conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi então incubado por mais 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas na microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou

² MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 1993.

iguais a 1:20. A positividade da reação implicou na observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (**Figura 1**) (RISTIC et al., 1972; NAKAGHI et al., 2008).



A



B

Figura 1. Reação de Imunofluorescência Indireta para *Ehrlichia canis*. **A:** soro de felino controle positivo. **B:** soro de felino controle negativo. Aumento de 1000 x

4.4.3. Obtenção de antígeno para confecção de lâminas de *Babesia canis*

O antígeno proveio da inoculação, em cães, de uma cepa de *B. canis*, isolada por MACHADO ³ (1999), a partir de um cão atendido no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, UNESP Jaboticabal.

Previamente à inoculação, realizou-se a PCR com oligonucleotídeos iniciadores para *B. canis*, cujo produto foi clivado com as endonucleases de restrição *Hinf I* e *Taq I*, obtendo-se assim um padrão de clivagem compatível com *B. canis vogeli* (FURUTA, 2004).

Dois cães, com aproximadamente 3 meses de idade, mantidos livres de ectoparasitas através do isolamento e utilização periódica de Fipronil®, vacinados contra as principais doenças infecciosas caninas por meio de vacinas comerciais (FortDodge®) e desverminados (Bayer®) foram mantidos no canil do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos à esplenectomia com o objetivo de baixar a resistência imunológica e facilitar a visualização dos parasitas nos esfregaços sangüíneos. Quatro dias após o procedimento cirúrgico, aproximadamente 8 mL de sangue (mantido criopreservado em igual volume com dimetilsulfóxido (DMSO) em nitrogênio líquido) de um cão parasitado com *B. canis*, foi descongelado em banho-maria a 37°C. Procedeu-se então, a inoculação experimental de um dos cães com o sangue parasitado através da via endovenosa.

O animal foi então submetido a avaliações diárias da sua condição física, temperatura retal e avaliação da parasitemia por meio de punções de sangue capilar obtido da ponta de orelha, três vezes ao dia, até se obter a parasitemia desejada (25%), no 5º dia pós-infecção.

A pesquisa por parasitas era feita através da coloração de esfregaços sangüíneos finos corados com Giemsa (Sigma®). Uma vez obtida a parasitemia desejada, colheu-se cerca de 10 mL de sangue parasitado em frascos com EDTA sódico a 7,5% como anticoagulante, procedendo-se à lavagem das hemácias com solução salina tamponada por 3 vezes. Com a papa de hemácias, foram realizados

³ MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 1999.

esfregaços sangüíneos finos em lâminas, previamente lavadas e desengorduradas em álcool/éter (70%/30%), as quais foram utilizadas como antígeno para a realização da RIFI para *B. canis*. Após secarem em temperatura ambiente, foram embrulhadas (individualmente) em papel absorvente extrafino, envoltas em papel alumínio e acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado a -20°C até o momento do uso. Parte do sangue do animal parasitado (20 mL) foi transferido para o outro cão esplectomizado, o qual apresentou pico de parasitemia 1 dia após a inoculação do mesmo. Colheu-se 10 mL de sangue parasitado para confecção de novas lâminas para RIFI, para preservação com DMSO em nitrogênio (-196°C) líquido e para extração de DNA (controle positivo para as reações de PCR). Após a colheita, os animais foram submetidos à fluidoterapia para o restabelecimento da volemia e administrou-se dipropionato de imidocarb (5,0 mg/kg), por via subcutânea, para o tratamento da babesiose.

4.4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia canis*

As amostras de soros foram diluídas a 1:40 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6 mM Na₂HPO₄; 1,0 mM KH₂PO₄; 0,8 mM NaH₂PO₄). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço da lâmina com antígeno de *B. canis*. Inicialmente, como controles, foram utilizados soros de cães sabidamente positivos e negativos frente ao antígeno de *B. canis*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 45 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (1,37 M NaCl; 26,82 mM KCl; 101,44 mM Na₂HPO₄; 17,63 mM KH₂PO₄), secas e a cada uma adicionados 10 µL de conjugado (anti-IgG de gato, marcado pelo isoticianato de fluoresceína para as amostras testes e anti-IgG de cão para os controles positivo e negativo), diluído conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi então incubado por mais 45 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. Foram consideradas positivas as reações em que toda a periferia do parasita apresentou fluorescência, a partir da diluição de 1:40, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (**Figura 2**) (FURUTA, 2004).

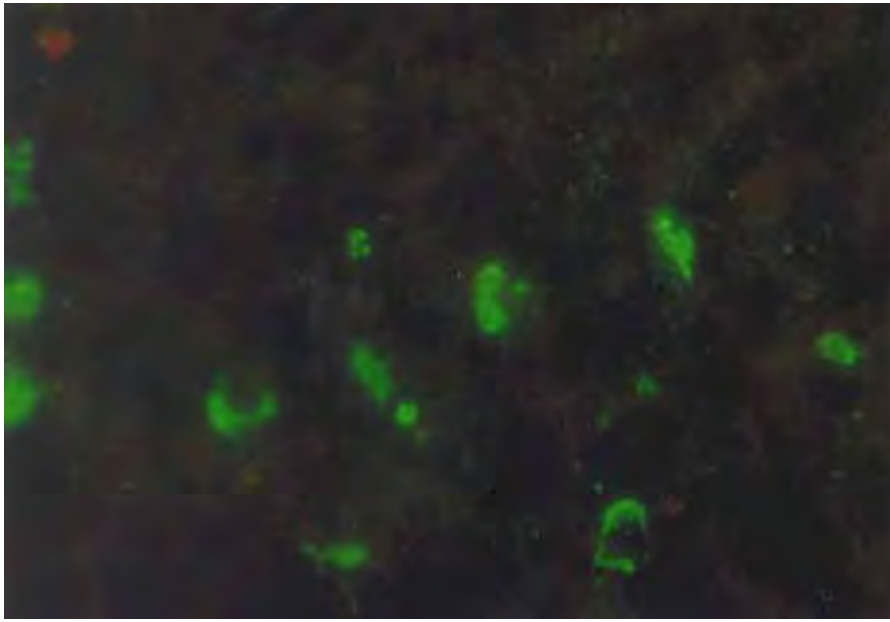
**A****B**

Figura 1. Reação de Imunofluorescência Indireta para *Babesia canis*. **A:** soro de felino controle positivo. **B:** soro de felino controle negativo. Aumento de 1000x.

4.5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.5.1. Extração de DNA de sangue total

A extração de DNA de sangue total foi realizada com o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20 °C para realização da PCR.

4.5.2. Amplificação do DNA do gênero *Ehrlichia*

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

4.5.3. Amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis*

A reação de amplificação do tipo *nested* para *E. canis* foi realizada utilizando-se os produtos obtidos da primeira amplificação (para gênero) como moldes para os *primers* para as próximas reações. Para as reações específicas para *E. canis* foram utilizados os primers ECAN5 (5'CAA TTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA 3') e HE3 (5'TATAGGTA CCGTCATT ATCTTCCCTAT-3').

Para a reação da *nested* PCR foram utilizadas as mesmas soluções da PCR, além de 1µL da amostra de DNA amplificado e os *primers* espécie-específicos. A

reação consistiu de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto, seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72 °C (MURPHY et al., 1998).

4.5.4. Amplificação do DNA da espécie *Babesia canis*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR foram baseados na seqüência parcial do gene da subunidade menor do 18S *rDNA* presente na maioria das espécies de babesias: Piro A (5'- AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e Piro B (5'- TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'). A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por CARRET et al. (1999), com algumas modificações, utilizando as mesmas soluções e concentrações da PCR para *E. canis*, com exceção da Taq Polimerase (Invitrogen®), da qual foi utilizada 0,5 U. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

4.5.5. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (Invitrogen®) (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb DNA Ladder -Invitrogen®). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®).

4.6. Reação de Seqüenciamento

4.6.1. Extração dos Amplímeros do Gel de Agarose

Após a reação de PCR, as bandas referentes a cada amplímero foram cortadas do gel de agarose com lâmina de bisturi estéril, pesadas e colocadas em tubos de

polipropileno de 2,0 mL devidamente identificados. Na seqüência, foi realizada extração do produto da PCR em gel de agarose, utilizando-se o kit GeneClean II (QBiogene®) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6.2. Quantificação de DNA dos ampliceros

Cada amostra extraída do gel foi então submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,0%, corado com Brometo de Etídeo 0.01% (Invitrogen®), em cuba horizontal, com solução de TEB 1X como fluido condutor de corrida. A eletroforese foi realizada em uma hora e trinta minutos com fonte a 50 mA e 100 V. Um marcador de peso molecular (“Low Mass DNA Ladder” - Invitrogen®) foi adicionado à primeira canaleta de cada gel analisado para se obter uma medida comparativa das quantidades de DNA das amostras.

4.6.3. Reação de Seqüenciamento

Os amplicons purificados e quantificados foram utilizados na concentração aproximada de 80-100 ng de DNA-amostra. Primeiramente, em gelo, foi preparado um mix da reação, composto de 3,5 µL de Tampão “Save-Money” (MgCl₂ 1M; Tris-HCl 1M pH 9,0; água estéril ultra pura q.s.p 200 µL), 0,5 µL de “BigDye” (Big Dye^r Terminator V3.1 9 Cycle Sequencing Kit, Applied BiosystemsTM) e 2 µL do oligonucleotídeo iniciador “forward” que originou o amplicero (na concentração de 5pmol/µL). Utilizou-se uma placa de 96 cavidades (PP- PCR plate – Mil Halben Rand Für ABI, Greiner Bio-OneTM) colocada em gelo, e a cada cavidade adicionaram-se, inicialmente, 3 µL de água ultra-pura, 1 µL da amostra a ser seqüenciada e 6 µL do mix. Para as amostras contendo baixas quantidades de DNA, foi adicionado maior volume da amostra, e o volume de água foi alterado (q.s.p 10 µL). A placa foi então submetida à centrifugação (Centrífuga de placa modelo – Rotina 46 R, Hettich-ZentrifugerTM) por 20 segundos, a 1200 rpm, e depois a placa foi vedada com Tampa de Silicone e colocada em aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller – Peltier Effect Cucling Cycler, Modelo PTC-100, MJ ResearchTM), com a programação de 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 52°C, 4 minutos a 60°C e, finalizando, a 4°C indefinidamente. Após essa etapa, foram adicionados 80 µL de Isopropanol 75% (temperatura ambiente) para cada

amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e incubada em centrífuga de placa (Rotina 46 R, Hettich-Zentrifuger™) a 20°C por 15 minutos. Após essa pausa, a placa foi centrifugada a 20°C, em 1310 x g, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Adicionou-se 200 µL de Etanol 70% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e centrifugada (Rotanta 46 R, Hettich-Zentrifuger™) a 20°C, em 1310 x g, por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Essa etapa foi realizada duas vezes. A placa foi colocada invertida e sem tampa sobre o papel toalha e centrifugada (Rotanta 46 R Hettich-Zentrifuger™) à temperatura ambiente em 1310 x g, por 20 segundos. Em seguida, a placa foi então colocada, sem tampa, em uma bomba de alto vácuo (Eduards™) por 5 minutos. Adicionou-se 9 µL de formamida (Hi Di, Applied Biosystems™) para cada amostra, vedou-se a placa com uma tampa de silicone e colocou-se no aparelho termociclador com a programação de 95°C, por 5 minutos, e finalização a 4°C. Logo após sair do termociclador, a placa foi colocada em gelo por 3 minutos. Após isto, a placa foi colocada no aparelho seqüenciador (3100 Hitachi Genetic Analyser – ABI PRISM, Applied Biosystems™).

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

4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.7.1. Análise dos produtos seqüenciados

Após seqüenciamento, as seqüências obtidas foram analisadas e confrontadas com aquelas já publicadas no GenBank, onde foram verificadas similaridades entre elas através do programa BLAST (BENSON et al., 2002).

5. RESULTADOS

5.1. Esfregaços sangüíneos a partir de perfuração de ponta de orelha

Não foram observados piroplasmas característicos de *Babesia sp.* em eritrócitos e mórulas características de *Ehrlichia sp.* em leucócitos em esfregaços sangüíneos a partir de perfuração de ponta de orelha corados com corante Giemsa.

5.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

5.2.1. Soropositividade para *Babesia canis*

Das 72 amostras de soros de felídeos neotropicais coletadas, 53 (73,6%) mostraram soropositividade frente ao antígeno de *B. canis*. Todos os seis gatos-mouriscos da Associação Mata Ciliar (Jundiaí – SP) foram sororeagentes. Oitenta e nove por cento das jaguatiricas amostradas nas cinco regiões do estudo mostraram anticorpos anti-*B. canis*. Em contrapartida, das nove suçuaranas, apenas duas foram sororeagentes (**Tabelas 3 e 4**). Cerca de 87% (41 animais) e 86% (seis animais) dos felídeos da Associação Mata Ciliar e do Zoológico de Ribeirão Preto, respectivamente, mostraram-se soropositivos. Dois dos seis animais do Zoológico de Pedreira e três dos 10 animais do Zoológico de Brasília apresentaram anticorpos anti-*B. canis*. Dos dois felinos amostrados no Zoológico de Brasília, um gato-do-mato-pequeno mostrou-se soropositivo.

Os títulos de anticorpos variaram de 1:40 (ponto de corte) a 1:1280. Dos 72 animais soropositivos, 6 apresentaram título de anticorpos de 1:40, 13 de 1:80, 17 de 1:160, 5 de 1:320, 2 de 1:640 e um animal apresentou titulação final de 1:1280. O felídeo que se mostrou mais soropositivo foi uma onça-pintada do Zoológico de Brasília (**Figura 3**).

5.2.2. Soropositividade para *Ehrlichia canis*

O número de animais sororeagentes frente ao antígeno de *E. canis* foi menor que daqueles reagentes a *B. canis*. Dezoito animais (25%) apresentaram anticorpos anti-*E.canis* A Associação Mata Ciliar foi o local onde o maior número de animais

soropositivos (34%) foi encontrado. Dos três gatos-palheiro da Associação Mata Ciliar, dois foram soropositivos; dos 6 gatos-mouricos, quatro apresentaram anticorpos anti-*E.canis*. Os animais dos Zoológicos de Campinas e Pedreira não se apresentaram sororeagentes. No Zôo de Brasília, apenas uma jaguatirica mostrou-se soropositiva e, no Zôo de Ribeirão Preto, apenas uma onça-pintada apresentou anticorpos anti-*B. canis* (**Tabelas 3 e 4**). Os títulos de anticorpos variaram de 1:20 (ponto de corte) a 1:2560. A maioria dos animais sororeagentes (77,7%) apresentou título de anticorpos de 1:20. Na AMC, uma suçuarana apresentou título de anticorpos 1:40, um gato-mourisco apresentou título de anticorpos 1:40 e, um gato-palheiro, título de anticorpos de 1:2560 (**Figura 3**).

Tabela 3. Número de felinos neotropicais soropositivos frente aos antígenos de *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, de acordo com a espécie animal e instituição de origem.

ESPÉCIE	NOME COMUM	ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR DE JUNDIAÍ	ZOOLOGICO DE PEDREIRA	ZOOLOGICO DE CAMPINAS	ZOOLOGICO DE RIBEIRÃO PRETO	ZOOLOGICO DE BRASÍLIA	NÚMERO DE ESPÉCIMES
Número de animais soropositivos para <i>B. canis</i>/ <i>E. canis</i>							
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	22/2	0/0	0/0	2/0	2/1	26/3
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	7/5	0/0	1/0	1/0	0/0	9/5
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato-maracajá	2/1	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1
<i>Oncifelis colocolo</i>	Gato-palheiro	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2
<i>Panthera onca</i>	Onça-pintada	1/1	2/0	0/0	2/1	1/0	6/2
<i>Puma concolor</i>	Suçuarana	1/1	0/0	0/0	1/0	0/0	2/1
<i>Puma yagouaroundi</i>	Gato-mourisco	6/4	0/0	0/0	0/0	0/0	6/4
TOTAL		41/16	2/0	1/0	6/1	3/1	53/18

Tabela 4. Número e porcentagem de felídeos sororeagentes aos antígenos de *B. canis* e *E. canis* de acordo com a espécie animal.

Espécie	Sororeagentes <i>B. canis</i>		Sororeagentes <i>E. canis</i>	
	Número de animais soropositivos/Número total de animais	Porcentagem de soropositividade (%)	Número de animais soropositivos/Número total de animais	Porcentagem de soropositividade (%)
Jaguatirica	26/29	89,65	3/29	10,34
Onça-pintada	6/9	66,66	2/9	22,22
Suçarana	2/9	22,22	1/9	11,11
Gato-palheiro	2/3	66,66	2/3	66,66
Gato-mourisco	6/6	100	4/6	66,66
Gato-do-mato-pequeno	9/14	64,28	5/14	35,71
Gato-maracajá	2/2	100	1/2	50,0
TOTAL	53/72	73,61	18/72	25,0

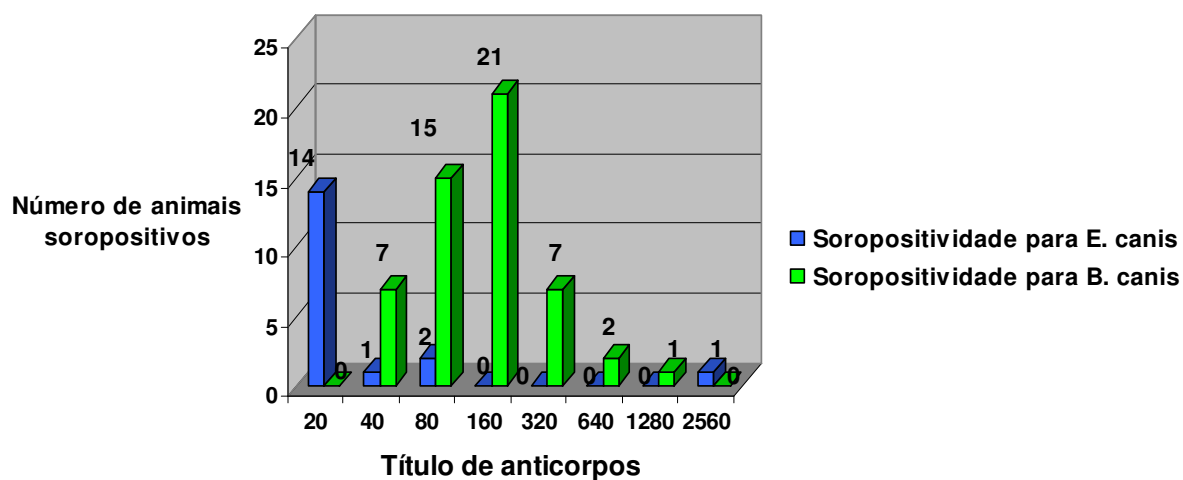


Figura 3. Representação gráfica da distribuição dos felídeos neotropicais em cativeiro amostrados segundo o título de anticorpos para *B. canis* e *E. canis*.

5.2.3. Co-soropositividade e co-soronegatividade para *B. canis* e *E. canis*

Dos 72 animais amostrados, 17 mostraram-se soropositivos para ambos os antígenos de *B. canis* e *E. canis*. Dezoito animais não foram reagentes para nenhum dos dois agentes.

Dos 53 animais soropositivos para *B. canis*, 36 deles foram soronegativos para *E. canis*. Dos 18 felídeos soropositivos para *E. canis*, apenas um animal não apresentou anticorpos anti-*B. canis* (**Tabela 5**).

Tabela 5. Co-soropositividade e co-soronegatividade dos felídeos amostrados frente aos antígenos de *E. canis* e *B. canis*.

	Animais sororeagentes a <i>B. canis</i>	Animais não-sororeagentes a <i>B. canis</i>	Total
Animais sororeagentes a <i>E. canis</i>	17	1	18
Animais não-sororeagentes a <i>E. canis</i>	36	18	54
Total	53	19	72

5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

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

Dos 72 animais amostrados, 11 mostraram-se positivos na PCR para *E. canis*. Na AMC, 7 animais foram positivos (5 jaguatiricas, 1 gato-mourisco e 1 gato-do-mato-pequeno). Nos demais zoológicos, apenas em 1 animal detectou-se a presença de fragmentos de DNA amplificados de *E. canis*: em 1 gato-do-mato-pequeno no Zoológico de Brasília, 1 onça-pintada nos Zoológicos de Pedreira e Campinas e em uma suçuarana de Ribeirão Preto (**Figura 5**).

Nenhum animal amostrado mostrou-se positivo na PCR para *B. canis*.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

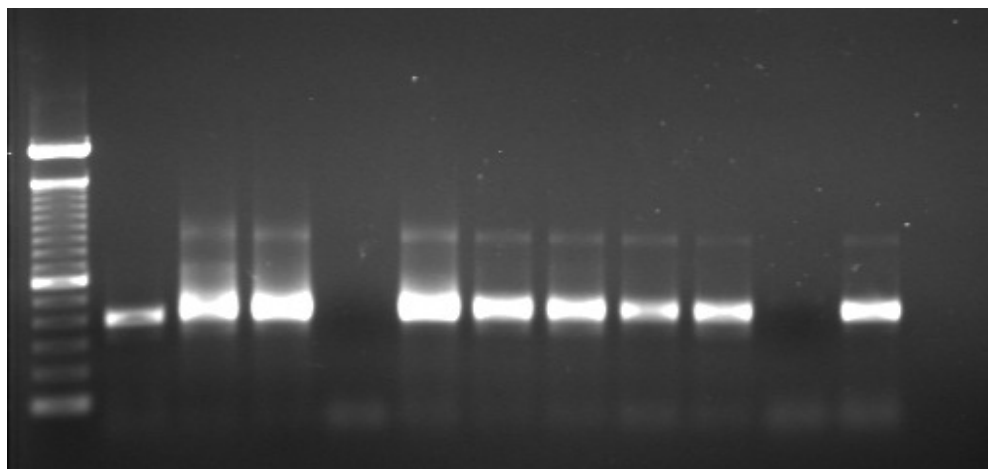


Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *E. canis* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN5/HE3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Canaleta 1: controle positivo (396pb); Canaleta 2 até 3: amostradas de jaguatirica positivas; Canaleta 4: gato-maracajá negativo; Canaleta 5 até 6: amostras positivas de jaguatirica; Canaleta 7 até 8: amostras positivas de gato-do-mato-pequeno; Canaleta 9: amostra positiva de puma; Canaleta 10: controle negativo; Canaleta 11: amostra positiva de onça-pintada.

5.3.2. Correlação dos resultados da PCR e sorologia para *E. canis*

Dos 18 animais positivos na PCR para *E. canis*, 4 deles também foram soropositivos para o agente em questão. Sete animais foram positivos na PCR, porém soronegativos. Quatorze animais apresentaram-se soropositivos, porém PCR negativos. Dos 72 felídeos amostrados, 47 mostraram-se negativos tanto na PCR quanto na sorologia para *E. canis* (**Tabela 6**).

Tabela 6. Correlação entre os resultados da PCR e sorologia para *E. canis* para os felídeos selvagens em cativeiro amostrados.

	Animais sororeagentes a <i>E. canis</i>	Animais não-sororeagentes a <i>E. canis</i>	Total
Animais positivos na PCR para <i>E. canis</i>	4	7	11
Animais negativos na PCR para <i>E. canis</i>	14	47	61
Total	18	54	72

5.4. Análise das similaridades de seqüências obtidas pelo BLAST

O programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) é utilizado para localizar alinhamentos entre uma seqüência de interesse pesquisada e dados existentes publicados no GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast>) (BENSON et al., 2002). Para analisar as similaridades entre as seqüências dos fragmentos de DNA de *E. canis* amplificados (obtidas a partir das amostras de sangue dos felinos selvagens) entre si e com aquelas depositadas no GenBank foram utilizados, respectivamente, os programas “BLAST 2 sequences” e “nucleotide BLAST”.

Os amplicómeros dos produtos dos oligonucleotídeos iniciadores (HE3/ECAN) do gene *16S rRNA*, seqüenciados das amostras positivas na PCR para *E. canis* revelaram 98-99% de similaridade entre si e altos graus de identidade com seqüências previamente publicadas no GenBank. As amostras de *E. canis* encontradas apresentaram similaridade por volta de 98%-99% com aquelas encontradas em cães do México (número de acesso EF424612.1), Brasil (número de acesso EF195134.1), Portugal (EF 051166), Tailândia (EF139458), Grécia (EF011111), Taiwan (EU178797) e gatos do Taiwan (EU143637).

6. DISCUSSÃO

Recentemente, diversos estudos têm sido realizados para investigar o possível papel dos animais selvagens na epidemiologia das doenças transmitidas por artrópodes vetores, os quais ajudariam na determinação de áreas de risco para possível infecção humana. Pouco se sabe a respeito da epidemiologia da erliquiose e babesiose em felinos selvagens, os quais poderiam servir como boas sentinelas para estes agentes, já que além de serem hospedeiros para os hemoparasitas e para os carrapatos vetores, possuem uma maior área de abrangência do que outros hospedeiros de carrapatos. Enquanto que estudos de patogenicidade e tratamento da destas enfermidades têm sido explorados intensivamente, a epidemiologia se mantém, em muitas regiões, especulativa. Os possíveis hospedeiros para os agentes causadores das enfermidades e os ciclos naturais de transmissão ainda não foram totalmente estabelecidos. A identificação de reservatórios selvagens para hemoparasitoses poderia ajudar na elaboração de medidas profiláticas a fim de reduzir a exposição do homem, animais domésticos e outros animais selvagens à infecção.

No presente estudo, não foram observadas mórulas características de *Ehrlichia sp.* em leucócitos nos esfregaços sangüíneos a partir de sangue de ponta de orelha dos animais estudados. Tais estruturas devem ser diferenciadas de estruturas intra e extracelulares semelhantes a elas, a fim de evitar diagnósticos falso-positivos, tais como: plaquetas, material nuclear fagocitado em monócitos, grânulos azurófilos em linfócitos e corpos linfoglandulares (MYLONAKIS et al., 2003). Mórulas características de *Ehrlichia sp.* em monócitos sangüíneos foram diagnosticadas em felinos domésticos na França (CHARPENTIER e GROULADE, 1986), Quênia (BUORO et al., 1989), Estados Unidos (BOULOY et al., 1994), Brasil (ALMOSNY et al., 1998) e em uma leoa africana (BUORO et al., 1994). Por outro lado, inclusões em neutrófilos foram encontradas em felinos domésticos na Suécia (BJOERSDORFF et al., 1999) e na Itália (TARELLO, 2005).

Na América Latina, o primeiro caso de erliquiose felina foi descrito no Rio de Janeiro, no qual foi observado o aparecimento de mórulas em leucócitos mono e polimorfonucleares em esfregaço sangüíneo de um gato com febre e sinais inespecíficos (ALMOSNY et al., 1998). Ainda, no Brasil, ALMOSNY e MASSARD

(1999), por meio de infecções experimentais em felinos domésticos jovens, verificaram a ocorrência de anemia normocítica-normocrômica, redução cíclica das plaquetas, leucopenia, aumento da atividade sérica das transaminases e fosfatase alcalina, hipoalbuminemia, elevação do fibrinogênio plasmático e uma pequena elevação dos níveis séricos de uréia e creatinina.

Da mesma forma, não foram observados piroplasmas característicos de *Babesia* sp. em eritrócitos dos felídeos amostrados. No Brasil, a primeira descrição de piroplasmas intra-eritrocíticos em felídeos foi realizada por MENDES-DE-ALMEIDA et al. (2004) em uma colônia urbana de felinos (*Felis catus*) de um zoológico do Rio de Janeiro, em que se observou a presença de piroplasmas indistinguíveis entre *Cytauxzoon spp.* e *Babesia spp.* em 47% dos animais. Ainda no Rio de Janeiro, GAZETA et al. (2004), constataram a presença de parasitas intra-eritrocíticos pleomórficos, em forma de dímeros, tétrades ou corpos únicos em esfregaços sangüíneos de uma fêmea de *Felis catus*. O parasita em questão diferiu morfometricamente de *B. felis*, *B. leo*, *B. pantherae* e *B. herpailuri*, representando provavelmente uma nova espécie de *Babesia*. Em Pernambuco, DANTAS-TORRES e FIGUEREDO (2006) encontraram inclusões intra-eritrocíticas pequenas e pleomórficas, com formato de manchas arredondadas em felinos domésticos, semelhantes àquelas observadas por GAZETA et al. (2004).

Os resultados do presente estudo corroboram com aqueles descritos na literatura, nos quais se verificou que tanto para o diagnóstico da erliquiose quanto para o da babesiose, a detecção direta dos parasitas por meio de esfregaços sangüíneos é uma técnica rápida e confirmatória, porém de baixa sensibilidade. Além do baixo número de células com mórulas ou parasitadas com *Babesia* (portadores assintomáticos e animais cronicamente infectados), a sensibilidade é afetada pela experiência do microscopista e pelo pequeno número de esfregaços e células examinadas (TABOADA, 1998; PADDOCK e CHILDS, 2003; MYLONAKIS et al., 2003; PASSOS et al., 2005).

Dos 72 animais amostrados, dezoito (25%) apresentaram anticorpos anti-*E. canis*. Embora o número de animais sororeagentes para *E. canis* encontrado tenha sido menor do que aquele para *B. canis*, a porcentagem de soroprevalência, no presente estudo, foi maior do que a maioria dos pesquisadores descreveram em estudos

soroepidemiológicos envolvendo felídeos domésticos e selvagens. Vale ressaltar que esta é a primeira descrição da presença de anticorpos anti-*E. canis* em outras espécies de felídeos selvagens, entre elas jaguatirica, onça-pintada, gato-palheiro, gato-mourisco, gato-do-mato pequeno, gato-maracajá e suçuarana. Estudos soroepidemiológicos demonstram sororeatividade a antígenos de agentes erliquiais em felinos domésticos (BOULOY et al., 1994; MATTHEWMAN et al., 1996; PEAVY et al., 1997; STUBBS et al., 2000; AGUIRRE et al., 2004; ORTUNO et al., 2005; LAPPIN et al., 2004; VITA et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2006; BILLETER et al., 2007), lincos (RYSER-DIGIORGIS et al., 2005), pumas (FOLEY et al., 1999) e em uma suçuarana brasileira (FILONI et al., 2006). Relatos anteriores mostram uma soroprevalência para *E. canis* variando de 0,98% a 82,4% entre felinos domésticos (PERRY et al., 1989; BOULOY et al., 1994; MATTHEWMAN et al., 1996; STUBBS et al., 2000; AGUIRRE et al., 2004; ORTUNO et al., 2005; VITA et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2006) e de 4,7% entre felídeos selvagens brasileiros (FILONI et al., 2007). Para *Anaplasma phagocytophilum*, as taxas de soroprevalência encontradas variaram de 1,8% a 4,3% em felinos domésticos (SOLANO-GALLEGO et al., 2006; BILLETER et al., 2007), 4% em lincos (RYSER-DIGIORGIS et al., 2005) e 17% em pumas (FOLEY et al., 1999). Já para *Neorickettsia risticii*, a soroprevalência relatada variou de 16,6% a 64,5% entre felinos domésticos amostrados (PERRY et al., 1989; BOULOY et al., 1994; PEAVY et al., 1997).

No presente trabalho, adotou-se como ponto de corte o título de 1:20, o mesmo usado para testes sorológicos em cães. A Reação de Imunofluorescência Indireta é considerada o teste padrão sorológico, embora a leitura dos resultados seja subjetiva e reações cruzadas entre as várias espécies de *Ehrlichia* sejam esperadas (BÉLANGER et al., 2002). Até o momento, não existe padronização deste teste entre laboratórios para a realização de testes sorológicos para *E. canis* usando soros de felinos e, ademais, um ponto de corte apropriado é ainda desconhecido (ORTUNO et al., 2005). Os títulos de anticorpos para *E. canis* entre os felídeos selvagens deste estudo variaram de 1:20 (ponto de corte) a 1:2560. A maioria dos animais sororeagentes (77,7%) apresentaram baixo título de anticorpos (1:20), corroborando com os resultados encontrados por ORTUNO et al. (2005). Títulos baixos podem ser explicados por uma resposta imune humoral anti-*E. canis* não relevante para felinos ou reações cruzadas

com outras espécies de *Ehrlichia* (ORTUNO et al., 2005). Interessantemente, MATTHEWMAN et al. (1996) encontraram um padrão de resposta imune pelo “Western Blotting” para felinos domésticos da África do Sul, semelhante àquele encontrado para soros de cães com baixos títulos de anticorpos anti-*E. canis* (menor que 1:160 pela RIFI), com reações fracas e direcionadas a poucos antígenos de *E. canis*, embora sempre reagindo contra a proteína imunodominante de 27kDa. Estes resultados sugerem a exposição destes animais a *E. canis* ou uma outra espécie filogeneticamente relacionada. No presente trabalho, embora tenhamos detectado molecularmente a presença de DNA de *E. canis* no sangue de alguns animais amostrados, confirmado pelo seqüenciamento, não podemos descartar a possibilidade de reações cruzadas na sorologia com outras espécies erliquiais, fazendo-se assim importante estudos adicionais a fim de determinar quais outros agentes da família *Anaplasmataceae* podem parasitar felídeos selvagens.

Embora a maioria dos animais sororeagentes do presente estudo tenham apresentado baixos títulos de anticorpos anti *E. canis*, um gato-palheiro da Associação Mata Ciliar apresentou título de anticorpos de 1:2560. Também, na Itália, na região de Abruzzo, VITA et al. (2005) detectaram anticorpos anti-*E. canis* em 2 felinos domésticos, mãe e filho, com títulos de 1:160 e 1:2560, respectivamente, dentre uma população de 203 animais amostrados. Alto título de anticorpos anti-*E. canis* (1:20480) foi detectado em uma suçuarana brasileira (*Puma concolor*) de vida livre (FILONI et al., 2006).

Cinqüenta e três felídeos (73,6%) mostraram-se sororeagentes frente ao antígeno de *B. canis*, com título de anticorpos variando de 1:40 a 1:1280. Esse é o primeiro relato da sororeatividade de felídeos selvagens frente ao antígeno de *B. canis*, evidenciando dessa forma, exposição desses animais ao agente da babesiose canina. A partir de uma amostra de 18 felinos domésticos de Kaapschehoop, África do Sul, PENZHORN et al. (1999) encontraram 11 animais soropositivos frente ao antígeno de *B. felis*, sendo que 3 desses animais apresentaram títulos de anticorpos maiores que 1:1280.

Supondo que a babesiose e a erliquiose felina sejam transmitidas por carrapatos, a maior soroprevalência de *B. canis* em relação à de *E. canis* pode ser explicada pelo fato de que a presença de animais infectados é necessária para a manutenção da *E. canis* em uma população de carrapatos já que não ocorre transmissão vertical nos

artrópodes (NEER, 1998). *Babesia canis vogeli*, entretanto, pode ser transmitida por via transovariana e ser passada para a próxima geração de carrapatos na ausência de animais infectados (LOBETTI, 1998; TABOADA, 1998; BOOZER e MACINTIRE, 2003).

Em cães, é muito comum a infecção concomitante por *E. canis* e *B. canis* (TROY e FORRESTER, 1990; TABOADA, 1998; OLIVEIRA, 2004; DAGNONE, 2006; NAKAGHI et al., 2008). No presente estudo, 17 animais mostraram-se soropositivos para ambos os antígenos de *B. canis* e *E. canis*. A Associação Mata Ciliar foi o local onde o maior número de animais soropositivaram para *B. canis* (87%) e para *E. canis* (34%). Esses dois fatos levam-nos a inferir a possível presença de vetores para ambos os hemoparasitas na Associação Mata Ciliar e, até mesmo, sugerir o mesmo vetor para os dois agentes. Um fator a ser considerado na grande soropositividade dos animais dessa instituição é o trânsito de animais selvagens no local, os quais são transportados e alocados nesta instituição, um Centro de Reabilitação de Animais Selvagens. Em zoológicos, adicionalmente aos procedimentos de translocação de animais entre as instituições, soma-se a presença de animais domésticos errantes (cães e gatos), os quais poderiam ser encontrados nesses locais. Com isso, esses animais podem carrear para o local vetores artrópodes infectados pelos agentes, ou ainda, sendo reservatórios para a manutenção da infecção dos vetores já existentes.

Embora se assuma que a erliquiose e a babesiose felina, como em outras espécies, sejam transmitidas por carrapatos, não existe evidência, até o momento, da via de transmissão em felinos. Exposição a carrapatos tem sido comunicada em aproximadamente 30% dos casos de erliquiose em felinos (LAPPIN, 2001). A possível transmissão da erliquiose felina tem sido sugerida em infestação com carrapatos do gênero *Ixodes* em um gato na Suécia (BJOERSDORFF et al., 1999), três felinos domésticos norte-americanos infectados com *A. phagocytophilum* (LAPPIN et al., 2004), presença de *Haemaphysalis leachi* em 3 felinos domésticos do Kênia (BUORO et al., 1989) e em uma leoa (BUORO et al., 1994) com mórulas em monócitos. No estudo envolvendo 76 felinos domésticos norte-americanos com sorologia positiva para *E. canis* e/ou *N. risticii* foi mostrado ter os animais mais acesso a ambientes extradomiciliares, quando comparados com os animais soronegativos para os agentes erliquiais, evidenciando a hipótese da transmissão da erliquiose felina por artrópodes vetores (STUBBS et al., 2000).

No presente estudo não foram encontrados carrapatos parasitando os animais amostrados. A aplicação periódica de produtos químicos para o controle de ectoparasitas é feita nas instituições amostradas, o que pode explicar a não verificação de carrapatos parasitando os felídeos do presente estudo. Em contrapartida, pulgas da espécie *Ctenocephalides canis* foram identificadas em animais da Associação Mata Ciliar e Zoológico de Ribeirão Preto. Vale ressaltar que, na PCR para *E. canis* e *B. canis*, nenhum produto foi amplificado a partir do DNA extraído dos ectoparasitas colhidos e identificados. No Chaco Paraguai, DURDEN et al. (2006), identificaram ectoparasitismo por pulgas (*Pulex simulans*) e carrapatos (*Amblyomma cajennense*, *A. parvum*, *A. tigrinum* e *A. triste*) em sete suçuaranas (*Puma concolor*) e sete onças-pintada (*Panthera onca*). No Brasil, LABRUNA et al. (2002) identificaram *Amblyomma cajennense*, *A. coelebs* e larvas não identificadas de *Amblyomma spp.* em suçuaranas e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e instares imaturos não identificados de *Amblyomma spp.* em onças-pintada.

Nenhum animal amostrado mostrou-se positivo na PCR para *B. canis vogeli*, espécie de babesia que comumente parasita cães no Brasil (FURUTA, 2004; PASSOS et al., 2005). No entanto, molecularmente, demonstrou-se que felinos podem ser infectados com *B. canis presentii* (BANETH et al., 2004), *B. canis canis* (CRIADO-FORNELIO et al., 2003), *B. felis* e *B. leo* (PENZHORN et al., 2001; BOSMAN et al., 2006). Por meio da amplificação, seqüenciamento e análises filogenéticas usando o genes 18S rRNA e 5,8 S, BANETH et al. (2004) detectaram DNA de uma nova subespécie de *B. canis*, *B. canis subesp. presentii*, em dois felinos domésticos de Israel. Ainda, na Espanha, presença de DNA de *B. canis canis* foi detectada em um felino doméstico com sintomatologia clínica de babesiose (CRIADO-FORNELIO et al., 2003). *Babesia felis* e *B. leo* ocorrem como infecções únicas ou co-infecções em várias espécies de felídeos da África do Sul, porém, mais freqüentemente em felinos domésticos e leões, respectivamente (LOPEZ-REBOLLAR et al., 1999; PENZHORN et al., 2001; PENZHORN et al., 2006; BOSMAN et al., 2006).

Considerando-se o fato de que dos 53 animais soropositivos para *B. canis*, nenhum se mostrou positivo na PCR, faz-se necessária a busca, por meio de ferramentas moleculares, de outros piroplasmas filogeneticamente relacionados a

Babesia spp. e que possam compartilhar antígenos semelhantes com *B. canis*, gerando reações cruzadas nos testes sorológicos.

A presença de DNA de *E. canis* foi detectada em 11 animais, dentre os quais 5 jaguatiricas, 1 gato mourisco, 2 gatos-do-mato-pequeno, 1 suçuarana e 1 onça-pintada. Através do seqüenciamento genético, o produto amplificado mostrou similaridade, com base na homologia do gene *16S rRNA*, com DNAs de *E. canis* em cães do México (número de acesso EF424612.1), Brasil (número de acesso EF195134.1), Portugal (EF051166), Tailândia (EF139458), Grécia (EF011111), Taiwan (EU178797) e gatos do Taiwan (EU143637). BREITSCHWERDT et al. (2002) detectaram DNA de *E. canis* em 3 felinos domésticos com manifestações clínicas de erliquiose, porém soronegativos frente ao antígeno de *E. canis*. Também, YIN-CHIACHUN et al. (2003) detectaram DNA de *E. canis* pela nested PCR em 2 de 17 felinos domésticos analisados (11,76%), os quais apresentavam-se soronegativos e anêmicos. Em Barcelona, TABAR et al. (2007) encontraram um animal positivo na PCR para os gêneros *Ehrlichia/Anaplasma* entre cem felinos domésticos. Ademais, DNA de *Anaplasma phagocytophilum* já foi detectado em felinos domésticos (BJOERSDORFF et al., 1999; LAPPIN et al., 2004) e pumas (FOLEY et al., 1999).

Considerando o fato do estado de São Paulo, região amostrada no estudo, ser endêmico para a erliquiose canina, o presente trabalho mostra uma baixa incidência do parasita em felídeos selvagens. Nosso resultado corrobora com as observações feita por LURIA et al. (2004), os quais não detectaram DNA de *Ehrlichia spp.*, *A. phagocytophilum* e *N. risticii* por meio da PCR em amostras de sangue de 553 felinos domésticos da Flórida. Da mesma forma, a partir de uma amostra de 92 felinos domésticos norte-americanos (e suas respectivas pulgas) do Alabama, Maryland e Texas, LAPPIN et al. (2005) também não detectaram DNA erliquial. O mesmo resultado foi obtido por EBERHARDT et al. (2006) para felinos domésticos no Arizona. Considerando que a nossa região de estudo (São Paulo) e três regiões de estudo norte-americanas sejam endêmicas para a infecção por *E. canis* em cães, os autores supracitados sugerem que felinos são mais resistentes à infecção ou menos expostos a vetores apropriados que os cães, ou ainda que removem os vetores antes que a transmissão dos hemoparasitas ocorra (supõe-se que seja necessário um tempo mínimo de 24-48 horas para o processo de transmissão). Também é possível que

felinos possuam menor número de cópias circulantes de DNA de *E. canis* que cães, gerando resultados falsos-negativos (LURIA et al., 2004; LAPPIN et al., 2005; EBERHARDT et al., 2006). Segundo SHAW et al. (2001), felinos parecem ser menos predispostos que cães a certas doenças transmitidas por carrapatos, tais como erliquiose, babesiose e hepatozoonose. ISHAK et al. (2006) admitem que estas infecções são raras e geograficamente definidas.

Tal fato não se deve única e exclusivamente ao menor parasitismo por carrapatos verificado em felinos, já que em áreas endêmicas não é incomum encontrar grandes infestações nesses animais. Felinos podem apresentar uma resistência inata ou adaptativa à infecção que limita o desenvolvimento da doença ou de certa forma, compromete a transmissão de agentes pelos carrapatos. Alternativamente, a natureza não específica dos sinais clínicos de felinos com erliquiose pode resultar em subdiagnóstico. Além disso, a associação da doença com a infestação por carrapatos pode ser menos óbvia em felinos de pêlo longo ou quando felinos não são examinados atentamente quanto à presença destes ectoparasitas (SHAW et al., 2001).

Quatorze felídeos foram negativos na PCR para *E. canis*, porém apresentavam anticorpos anti-*E. canis*. Para cães infectados com *E. canis*, a sensibilidade da nPCR varia de 0,2 pg (WEN et al., 1997) a 1,12 pg DNA (NAKAGHI et al., 2008). O maior título de anticorpos anti-*E. canis* foi verificado em um gato-palheiro da Associação Mata Ciliar de Jundiaí, o qual mostrou-se negativo na PCR, estando possivelmente na fase crônica da erliquiose. A sensibilidade da PCR na identificação de agentes erliquiais nos felinos com infecção crônica é desconhecida. Os organismos erliquiais podem ser seqüestrados no baço e não serem encontrados no sangue circulante. Se a infecção em felinos mimetiza a erliquiose canina, grande número de felinos com doença subclínica pode existir. Tais animais podem, dessa forma, serem identificados pela sorologia (LEGENDRE et al., 2000; BILLETER et al., 2007). Por outro lado, os felinos podem ter debelado o parasita, porém mantiveram o título de anticorpos em níveis ainda detectáveis (BILLETER et al., 2007).

No presente trabalho, sete animais apresentaram-se positivos na PCR para *E. canis*, porém foram soronegativos. Em 3 felinos domésticos com evidência molecular de infecção por *E. canis*, não foram detectados anticorpos anti-*E. canis*, embora se tratasse de uma infecção crônica (BREITSCHWERDT et al., 2002). Estes resultados

sugerem que nem todos os felinos soroconvertem quando infectados com *Ehrlichia spp.* ou que exista um outro organismo similar a *E. canis*, que tenha seu gene amplificado, mas que seja distinto o suficiente para não induzir reações cruzadas de anticorpos (BREITSCHWERDT et al., 2002; EBERHARDT et al., 2006; BILLETTER et al., 2007). Por outro lado, no presente estudo, todos os quatro animais positivos na PCR apresentaram títulos de anticorpos de 1:20, podendo-se sugerir que tais animais estavam em uma fase precoce da infecção.

Todos os animais positivos na PCR ou sorologia para *E. canis* e/ou *B. canis* estavam aparentemente saudáveis. Assim, felinos selvagens brasileiros podem atuar como potenciais reservatórios para *E. canis* e *B. canis*, mostrando uma forma não sintomática das enfermidades causadas por estes agentes. Embora ainda não se saiba o efeito destas infecções sobre a saúde dos felinos selvagens brasileiros, a potencial ameaça que tais agentes podem representar não pode ser descartada, uma vez que a maioria destas espécies de animais se encontra atualmente ameaçada de extinção. A presença de infecção com um desses parasitas em combinação com estresse ou outros fatores, tais como imunossupressão, poderá desencadear uma doença. Uma *Babesia sp.* não caracterizada causou babesiose fatal em duas pumas em cativeiro no Egito, as quais foram translocadas da Califórnia, Estados Unidos (CARPANO, 1934 *apud* FOLEY et al., 2006). Ainda, no Quênia, foi detectada a presença de mórulas semelhantes à *Ehrlichia sp.* em monócitos de uma leoa adulta morta com histórico de letargia, pobre condição corporal e infestação com carrapatos do gênero *Haemaphysalis* (BUORO et al., 1994). Assim, sugere-se que novos protocolos de quarentena, exames laboratoriais e cuidados com relação à translocação de animais entre instituições sejam tomados, a fim de contemplar as emergentes enfermidades transmitidas por carrapatos.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste experimento, podemos concluir que:

1. Felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro são expostos aos agentes da erliquiose e babesiose caninas;
2. A soroprevalência para *Babesia canis* é maior que aquela para *Ehrlichia canis* entre os felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro;
3. Felinos selvagens responderam com baixo título de anticorpos frente o antígeno de *E. canis*;
4. A PCR, associada ao seqüenciamento, permitiu a confirmação dos amplicómeros obtidos das amostras de *E. canis*;
5. O DNA de *E. canis* que infecta felídeos selvagens no Brasil apresentou similaridade genética com o DNA de outras *E. canis* que infectam cães no Brasil, México, Portugal, Grécia , Tailândia e gatos no Taiwan.

8. REFERÊNCIAS

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

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

ALECRIM, I.; PINTO, B.; ÁVILA, T.; COSTA, R.; PESSOA, I. Registro do primeiro caso de infecção humana por *Babesia sp.* no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 11-29, 1983.

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

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

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

AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Red and gray foxes – potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 9, n. 1, p. 47-50, 1973.

AVERBECK, G.A.; BJORK, K.E.; PACKER, C.; HERBST, L. Prevalence of hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti

National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 26, n. 3, p. 392-394, 1990.

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

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

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

BÉLANGER, M.; SORENSON, H.L.; FRANCE, M.K.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 9, p. 3506-3508, 2002.

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

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

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

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

BOURDEAU, P.; GUELFY, J.F. La babesiose canine à *Babesia canis*. **Le Point Veterinaire**, Maison Alfort, v. 27, n. 168, p. 103-110, 1995.

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

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

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

BREITSCHWERDT, E.B.; ANTHONY, C.G.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; LAPPIN, M.R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S.I.; COWAN, S.M.; CLOOTEN, J.K.; HEGARTY, B.C.; HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, n. 6, p. 642-649, 2002.

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

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

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

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

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

CASTRO, M.B. **Avaliação histopatológica e caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em órgãos linfóides e lesões na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis***. 2004. 75f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

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

COSTA, P. S. G.; VALLE, L. M. C.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. More about Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of new nine cases.

The Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, v. 10, n. 1, p. 7-10, 2006.

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

CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RIO; M. A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBACARRETERO, J. C. The “expanding universe of piroplasms”. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 337-345, 2004.

DAGNONE, A.S. **Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal – SP e de Campo Grande – MS**. 2006. 118 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

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

DAVIS, L.J. On a piroplasm of the Sudanese cat (*Felis ocreata*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 22, p. 523-534, 1929.

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

DENNIG, H.K. Eine unbekannte Babesienart beim jaguarondi (*Herpailurus yagouaroundi*). **Kleintierpraxis**, Hannover, v. 12, p. 146-152, 1967.

DENNIG, H.K.; BROCKLESBY, D.W. *Babesia pantherae* new species, a piroplasm of the leopard *Panthera pardus*. **Parasitology**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 525-532, 1972.

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

DURDEN, L. A.; CUNNINGHAM, M. W.; MCBRIDE, R.; FERREE, B. Ectoparasites of free-ranging pumas and jaguars in the Paraguayan Chaco. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 189-193, 2006.

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

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

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

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

FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; JECKER, M.; SWIFT, P.K.; MADIGAN, J.E. Granulocytic Ehrlichiosis and tick infestation in mountains lions in California. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 35, n. 4, p. 703-709, 1999.

FURUTA, P.I. **Avaliação comparativa entre o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*.** 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

FUTTER, G.J.; BELONJE, P.C. Studies on feline babesiosis. 2. Clinical observations. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v. 51, n. 3, p. 143-146, 1980 b.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KAKOMA, I.; MEHLHORN, H. Babesia of domestic animals. In:_____.KREIER, J.P. **Parasitic protozoa**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1994. v. 7, p. 141-216.

KJEMTRUP, A.M.; CONRAD, P.A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 11-12, p. 1323-1337, 2000.

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

LABRUNA, M.B.; DE PAULA, C.D.; LIMA, T.F.; SANA, D.A. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera Hydroelectric Power Station Area, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1133-1136, 2002.

LAPPIN, M., 2001. Feline ehrlichiosis and hemobartonellosis. In: World Small Animal Veterinary Association World Congress, 26., 2001, Vancouver. **Proceedings...**

Disponível em: <<http://www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00111.htm>>. Acesso em 20 jan 2007.

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

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILLEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2005.

LEGENDRE, A.M. Ehrlichiosis in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, n. 641, p. 614, 2002.

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

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

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

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

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

MARSAUDON, E.; CAMENEN, J.; TESTOU, D.; BOURREE, P.; SAMSON, P.; LUNEAU, F. Une babesiose humaine a *Babesia canis*, responsable d'une anurie de 40 jours. **Annales Medicinæ Internæ**, Paris, v. 146, n. 6, p. 451-452, 1995.

MARQUARDT, W.C.; DEMAREE, R.X.; GRIEVE, R.B. **Parasitology and vector biology**. 2nd. ed. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000. p. 211-224.

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

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

MELIANI, P.; KHABITI, S.; RANDAZOO, S.; GORENFLOT, A.; MARCHOU, B. Babésioses humaines. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 36, n. 10, p. 499-504, 2006.

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

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

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

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

NAKAGHI, A.C.H; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, 2008. No prelo.

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

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

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

OLIVEIRA, T.M.F.S. **Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em soros de cães do município de Jaboticabal, área não endêmica para a doença.** 2004. 46 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

ORÍÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis*.** 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

PENZHORN, B.L.; LEWIS, B.D.; LÓPEZ-REBOLLAR, L.M.; SWAN, G.E. Screening of five drugs for efficacy against *Babesia felis* in experimentally infected cats. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v. 71, n. 1, p. 53-57, 2000.

PENZHORN, B. L.; SCHOEMAN, T.; JACOBSON, L. S. Feline babesiosis in South Africa: a review. **Annals of New York Academy Sciences**, New York, v. 1026, p. 183-186, 2004.

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

PENZHORN, B.L.; STYLIANIDES, E.; COETZEE, M.A.; VILJOEN, J.M.; LEWIS, B.D. A focus of feline babesiosis at Kaapschehoop on the Mpumalanga escarpment. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 60, 1999.

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

POTGIETER, F.T. Chemotherapy of *Babesia felis* infection: efficacy of certain drugs. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v. 52, n. 4, p. 289-293, 1981.

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

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

RYSER-DEGIORGIS, M. P.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LEUTENEGGER, C. M.; SEGERSTAD, C. H.; MÖRNER, T.; MATTSSOM, R.; LUTZ, H. Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 1, p. 58-66, 2005.

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

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

SILVA, V.L.D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental**. 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic bacteria. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 2, 119-125, 1976.

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

STEWART, C.G.; HACKETT, K.J.W.; COLLETT, M.G. An unidentified *Babesia* at the domestic cat (*Felis domesticus*). **Journal of the South Africa Veterinary Association**, v., 51, n.4, p. 219-221, 1980.

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

TABAR, M.D.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2008. No prelo.

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

TAMÍ, I. DEL. C. DE.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia sp.* em las plaquetas de pacientes com infección por virus de la inmunodeficiencia humana, em Venezuela. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 16, n. 5, p. 345-349, 2004.

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

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; DE MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Ásia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1-2, p. 177-180, 2006.

TROY, G.C.; FORRESTER, S.D.. Canine ehrlichiosis. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 404-418.

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

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

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in

Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2788-2793, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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