

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

GEOVANA GONÇALVES BARBOSA

DETECÇÃO MOLECULAR DE *ANAPLASMA SPP.* EM GATOS DOMÉSTICOS

UBERLÂNDIA

2023

GEOVANA GONÇALVES BARBOSA

DETECÇÃO MOLECULAR DE *ANAPLASMA SPP.* EM GATOS DOMÉSTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Santana da Hora

UBERLÂNDIA

2023

GEOVANA GONÇALVES BARBOSA

DETECÇÃO MOLECULAR DE *ANAPLASMA SPP.* EM GATOS DOMÉSTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 30 de novembro de 2023

Banca Examinadora:

Aline Santana da Hora – Doutora (UFU)

Matias Pablo Juan Szabó – Doutor (UFU)

Lana Isabella Gila – Mestranda (UFU)

Dedico este trabalho à minha família, pelo estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, minha família e meu noivo que foram meu alicerce durante toda a trajetória de graduação.

Agradeço a minha orientadora por todo incentivo, motivação e direcionamento nesta caminhada acadêmica.

Agradeço aos colegas de laboratório e todos os amigos que em muito contribuíram para este trabalho e minha carreira profissional.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós
ignoramos alguma coisa.”

(Freire, 2002)

RESUMO

Estudos epidemiológicos de agentes transmitidos por carrapatos são mais descritos em cães quando comparados aos gatos. *Anaplasma* spp. é um dos principais causadores de doenças transmitidas por vetores, estes agentes são bactérias Gram negativas da família Anaplasmataceae, que é composta por espécies como *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. ovis* e *A. platys*. São responsáveis por infectar células sanguíneas como eritrócitos, plaquetas e leucócitos de vertebrados, sendo capazes de formar mórulas no interior das células infectadas. A patogenia para anaplasmoze é melhor esclarecida com relação à espécie *A. phagocytophilum*, especialmente em cães, porém ela pode acometer cavalos, ruminantes, gatos e até humanos. Em geral, os agentes são transmitidos pela picada de carrapatos pertencentes ao gênero *Ixodes* ou *Rhipicephalus sanguineus*, que estão entre os principais vetores da doença. Seus sinais clínicos são inespecíficos, visto que anorexia, letargia, febre, desidratação e anemia são os achados nos hospedeiros sintomáticos, porém casos assintomáticos podem ocorrer, onde o animal é portador e pode transmitir mesmo que não apresente manifestações clínicas. O diagnóstico da enfermidade pode ser direto ou indireto, porém os métodos moleculares apresentam maior sensibilidade na detecção do agente. Portanto, esse estudo buscou relatar a ocorrência de *Anaplasma* spp. em gatos domésticos por meio de PCR, porém, apresentou negatividade nas amostras testadas. Sendo assim, realizou-se a análise epidemiológica acerca de sexo, raça idade e status para algumas doenças infecciosas, bem como teorizou-se sobre os possíveis motivos das amostras terem sido negativas.

Palavras-chave: Anaplasmoze; felinos; PCR.

ABSTRACT

Epidemiological studies of tick-borne agents are more frequently described in dogs compared to cats. *Anaplasma* spp. is one of the main causes of vector-borne diseases, these agents are Gram-negative bacteria from the Anaplasmataceae family, which is made up of species such as *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. ovis* and *A. platys*. They are responsible for infecting blood cells such as erythrocytes, platelets and leukocytes of vertebrates, being capable of forming morulas inside the infected cells. The pathogenesis of anaplasmosis is best understood in relation to the species *A. phagocytophilum*, especially in dogs, but it can affect horses, ruminants, cats and even humans. In general, the agents are transmitted by the bite of ticks belonging to the genus *Ixodes* or *Rhipicephalus sanguineus*, which are among the main vectors of the disease. Its clinical signs are non-specific, as anorexia, lethargy, fever, dehydration and anemia are found in symptomatic hosts, however asymptomatic cases can occur, where the animal is a carrier and can transmit it even if it does not present clinical manifestations. The diagnosis of the disease can be direct or indirect, but molecular methods have greater sensitivity in detecting the agent. Therefore, this study sought to report the occurrence of *Anaplasma* spp. in domestic cats using PCR, however, it showed negativity in the tested samples. Therefore, an epidemiological analysis was carried out regarding sex, race, age and status for some infectious diseases, as well as theorizing about the possible reasons why the samples were negative.

Keywords: Anaplasmosis; cats; PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primers utilizados na reação de PCR em tempo real para a detecção de <i>Anaplasma</i> spp.	21
Tabela 2 -	Caracterização dos gatos com base na faixa etária	22
Tabela 3 -	Caracterização para imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) por PCR em gatos domésticos	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato aminotransferase
EGH	Ehrlichiose granulocítica humana
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
FVBP	Patógenos felinos transmitidos por vetores
IFA	Imunofluorescência indireta
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
POC	Teste <i>point of care</i>
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
WB	<i>Western immunoblot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3	RESULTADOS.....	22
4	DISCUSSÃO.....	24
5	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Existem muitos patógenos causadores de doenças que possuem sua transmissão com a participação de carrapatos como vetores e estes são mais bem relatados epidemiologicamente em cães quando comparados aos gatos (André *et al.*, 2022). *Anaplasma* spp. pertence a um grupo de proteobactérias Gram-negativas dentro da família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales (Harvey *et al.*, 1978). Possui forma cocobacilar e pode ser pleomórfica, contendo aproximadamente 0,2 - 1,0 micrômetros de diâmetro (Dumler *et al.*, 2001).

Dente elas, *Anaplasma phagocytophilum* é capaz de causar anaplasmoose granulocítica, sendo assim, infecta especialmente neutrófilos de diversas espécies animais, como cães, cavalos, ruminantes, humanos e felinos (Dumler *et al.*, 2001). Essa espécie destaca-se neste grupo pelo seu potencial zoonótico sendo considerado um agente emergente transmitido por ixodídeos (Silaghi *et al.*, 2017).

Até 2001, *A. phagocytophilum* pertencia ao gênero *Ehrlichia* e compreendia *E. phagocytophila* - agente da febre da carraça em ruminantes, *E. equi* - agente da ehrlichiose granulocítica equina e o agente da ehrlichiose granulocítica humana (EGH), (Hodzic *et al.*, 1998). A partir desse ano, houve reorganização da classificação taxonômica dos membros da ordem Rickettsiales, especialmente da família Anaplasmataceae e levou à inclusão destes agentes no gênero *Anaplasma*, tendo em vista que as mudanças foram baseadas em estudos moleculares que permitiram a caracterização mais precisa desses agentes (Dumler *et al.*, 2001).

Outra espécie importante relatada em gatos trata-se de *Anaplasma platys*, um agente que possui tropismo por plaquetas e é relacionada aos sinais clínicos de trombocitopenia, leucopenia e anemia (Alberti & Sparagano, 2006).

A termo de citação, outras espécies de *Anaplasma* foram identificadas em diferentes hospedeiros, onde apresentaram variedade com relação ao tropismo celular (Zobba *et al.*, 2015), sendo *Anaplasma marginale*, *A. bovis* e *A. centrale* responsáveis por infectar eritrócitos de bovinos e ruminantes selvagens (Dumler *et al.*, 2001), além de *A. ovis* que infecta a linhagem sanguínea vermelha de pequenos ruminantes (Renneker *et al.*, 2013).

Portanto, as espécies de *Anaplasma* descritas são responsáveis por infectar células sanguíneas, como eritrócitos e leucócitos, além das endoteliais (Munderloh *et al.*, 2004) e da linhagem megacariocítica (Granick *et al.*, 2009) de várias espécies de vertebrados, onde formam microcolônias no interior das células, sendo denominadas de mórulas (Dumler *et al.*, 2001).

Enfatiza-se que os vetores transmissores de *Anaplasma* spp., bem como as vias de transmissão da infecção natural não estão totalmente estabelecidas, sendo provável que a

ingestão de roedores e exposição a artrópodes sejam importantes formas de infectar os gatos (Beaufils *et al.*, 1999; Lappin, 2001). Dessa forma, os vetores nos Estados Unidos, são ixodídeos das espécies *I. scapularis* e *I. pacificus*, porém, na Europa, o principal vetor é *I. ricinus* (Inokuma 2007; Foley *et al.*, 2008). Em Portugal, identificou-se *Anaplasma phagocytophilum* em *I. ricinus* e *I. ventralis* (Santos *et al.*, 2009). Além disso, a infecção por *Anaplasma* spp. está associada a outros ixodídeos, como *Dermacentor* spp. e *Rhipicephalus sanguineus*, embora a sua importância epidemiológica esteja, ainda, pouco esclarecida (Nováková & Víchová, 2010).

A infecção por *A. phagocytophilum* em gatos foi descrita na Suécia, Estados Unidos, Itália, Espanha, Finlândia, Alemanha, Polónia e Brasil (Bjoersdorff *et al.*, 1999; Lappin *et al.*, 2004; Magnarelli *et al.*, 2005; Tarello, 2005; Solano *et al.*, 2006; Billeter *et al.*, 2007; Heikkila *et al.*, 2010; Ayllón *et al.*, 2012; Hamel *et al.*, 2012; Gorna *et al.*, 2013; Ebani & Bertelloni, 2014; Hegarty *et al.*, 2015; André *et al.*, 2017; André *et al.*, 2022). Além disso, *A. platys* foi detectada em felinos do Brasil, Estados Unidos, Tailândia e Itália (Santarém *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010; Salakij *et al.*, 2012; Qurollo *et al.*, 2014; Zobba *et al.*, 2015).

1.1 *Anaplasma phagocytophilum*

A primeira descrição de anaplasmoze granulocítica deu-se em 1932, na Escócia, quando ovinos foram diagnosticados com parasitismo por *Ixodes ricinus* (Gordon *et al.*, 1932). Posteriormente, foi descrita em cavalos, cães, gatos e em 1994, nos Estados Unidos, ocorreu o primeiro diagnóstico em humanos, portanto, considera-se uma zoonose de alto risco para a saúde pública (Dumler *et al.*, 2001). Além disso, *A. phagocytophilum* foi considerado um importante agente zoonótico transmitidos por ixodídeos na Alemanha (Kohn, 2008).

A patogenia para anaplasmoze felina é pouco esclarecida, porém para *A. phagocytophilum* há mais informações descritas em outras espécies de hospedeiros, como cães e humanos (Shäffer & Kohn, 2020). Em geral, o patógeno é transmitido por meio da picada de carrapatos do gênero *Ixodes*, embora haja evidências da espécie *Rhipicephalus sanguineus* como vetor, especialmente no Brasil (Woody & Hoskins *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2011).

Os agentes apresentam três estágios de desenvolvimento: corpúsculos elementares, corpúsculos iniciais e mórulas. As mórulas têm diâmetro de 0,2 a 1,3 micrômetros, podendo conter de 1 a 3 vacúolos de membrana simples formados por 1 a 18 organismos que se dividem por fissão binária (Campbell, 1994).

A transmissão de *Anaplasma phagocytophilum* aos mamíferos ocorre quando um carrapato infectado se alimenta do sangue do hospedeiro, por um período de 24 a 48 horas e então, dissemina-se pelo corpo do animal por meio do sangue e linfa (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Silveira *et al.*, 2015). Essa transmissão pode ocorrer no estado de ninfa ou adulto (Nicholson *et al.*, 2010; Day 2011). Porém, há outras formas de infectar os hospedeiros, como vias transfusional, perinatal e até transplante de órgãos nos humanos (Assi *et al.*, 2007; Kohn *et al.*, 2008; Shields *et al.*, 2015). O período de incubação pode variar entre uma e duas semanas (Woldehiwet, 2010). Além disso, a presença de *A. phagocytophilum* foi constatada parasitando aves migratórias, um fato que pode colaborar no aumento do seu potencial de transmissão em animais domésticos e humanos (Leblond *et al.*, 2005; Inokuma, 2007; Stuen, 2007).

Os neutrófilos são infectados ao realizarem endocitose do agente, após adesão mediada pela proteína P-selectina (Goodman *et al.*, 1999; Rikihisa, 2006). Ao penetrar a membrana celular dos fagossomos, ocorre a proliferação bacteriana para formação das mórulas (Popov *et al.*, 1998). No interior celular, o agente inibe funções importantes para o funcionamento dos neutrófilos, como a motilidade neutrofílica, e a própria realização de fagocitose, além de liberar radicais reativos de oxigênio e interagir com células endoteliais, que são meios para garantir a sobrevivência e proliferação do agente (Carlyon & Fikrig, 2006; Garcia-Garcia *et al.*, 2009). A quebra dos fagossomos e da membrana celular do hospedeiro libera o patógeno e este pode infectar outras células e órgãos (Roberts & Soave, 1997; Bjoersdorff, 2005).

Nos gatos, *A. phagocytophilum* causa sinais clínicos inespecíficos, como letargia, febre, redução de apetite, desidratação, mucosas pálidas, taquicardia, dor abdominal e nos membros (Foley *et al.*, 2003). Nos achados hematológicos relatou-se reduções significativas no hematócrito, leucocitose e pancitopenia, enquanto nos exames bioquímicos houve aumento nos valores das enzimas hepáticas: alanina transaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), (Bjoersdorff *et al.*, 1999, Heikkila *et al.*, 2010, Pennisi *et al.*, 2017). Porém, alguns gatos infectados podem ser assintomáticos, constituindo risco maior de transmissão por serem hospedeiros portadores (Heikkila *et al.*, 2010).

O primeiro relato de caso da infecção por *A. phagocytophilum* em um gato ocorreu na Suécia, em 1999. O episódio foi relatado como erliquiose granulocítica e o agente descrito como *Ehrlichia phagocytophila* foi detectado por exame citológico, com constatação de inclusões em 24% de seus neutrófilos, além de sinais clínicos como letargia, anorexia, taquipneia, desidratação e febre (Bjoersdorff *et al.*, 1999).

Em 2004, nos Estados Unidos, descreveu-se que cinco gatos domésticos com manifestação clínica inicial de febre foram testados por meio da reação em cadeia pela

polimerase (PCR) e constatou-se que todos os animais apresentavam infecção por *A. phagocytophilum*, por meio do sequenciamento genético, que demonstrou 99% de homologia com o patógeno pesquisado (Lappin *et al.*, 2004). Na mesma localidade, no ano de 2005, relatou-se a prevalência de anticorpos contra *A. phagocytophilum* por meio de dois métodos, imunofluorescência indireta (IFA) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), portanto, detectou-se respectivamente, 30% (28/93) e 38% (35/93) de amostras positivas em soro sanguíneo de 93 gatos, sendo que 90,32% (84/93) eram gatos saudáveis e 9,67% (9/93) apresentavam sinais clínicos inespecíficos como febre, anorexia, claudicação e fadiga (Magnarelli *et al.*, 2005).

Ademais, constatou-se a presença do patógeno na Itália, também em 2005, quando encontrou-se inclusões neutrofílicas correspondentes a mórulas em 6% (15/250) dos gatos, sendo que dentre os sinais clínicos observados estavam anorexia, letargia, hiperestesia, e claudicação. Além disso, tratamentos prévios com antibióticos foram relatados em 40% (6/15) dos gatos e 13,3% (2/15) possuía histórico de exposição a carrapatos. A detecção citológica foi classificada conforme a quantidade de neutrófilos com inclusões, sendo assim, havia felinos com 1 e até 21% de neutrófilos afetados e este último, apresentou vômitos, trombocitopenia, taquipneia e altralgia, porém recuperou-se após tratamento com doxiciclina (Tarello, 2005).

Em 2006, na Espanha, 168 amostras de soro sanguíneo de gatos foram testadas para anticorpos por IFA e, detectou-se 1,8% de positividade para *A. phagocytophilum*, sendo que a população amostrada foi composta por 41,6% (70/168) dos gatos clinicamente saudáveis e 35,7% (60/178) acometidos por várias doenças no momento do teste (Solano *et al.*, 2006). Posteriormente, utilizou-se de mesmo método diagnóstico em 460 amostras de sangue felino, nos Estados Unidos, em 2007, portanto, foi detectada positividade para anticorpos contra *A. phagocytophilum* em 4,3% (20/460), porém, esses resultados não puderam ser confirmados por meio de análise em PCR, visto que todas as amostras foram negativas nesse segundo teste (Billeter, *et al.*, 2007).

Na Finlândia, em 2010, houve um relato de caso em um felino cujo diagnóstico provisório baseou-se na presença de inclusões neutrofílicas, porém, o resultado confirmatório foi o positivo na PCR em tempo real para anaplasrose, juntamente com sinais clínicos de febre, taquipneia, linfopenia, secreção ocular e lesões cutâneas indicando exposição a carrapatos (Heikkilä *et al.*, 2010). Em 2012, também na Espanha, descreveu-se 8,4% (57/680) de amostras de sangue positivas para *A. phagocytophilum* por meio de sororreatividade. Em sequência, realizou-se PCR das amostras, porém não houve positividade (Ayllón *et al.*, 2012).

Também em 2012, na Alemanha, foram testadas 326 amostras de soro sanguíneo e 306 de sangue total por método direto, onde 0,1% (1/326) apresentou positividade para *A. phagocytophilum* em PCR, porém, não foram visualizadas inclusões citoplasmáticas. Além disso, em 16,2% (53/326) de amostras de soro sanguíneo detectou-se a presença de anticorpos para o agente por meio de IFA (Hamel *et al.*, 2012).

Em 2013, na Polônia um relato de caso detectou anaplasiose em um gato semi-domiciliado, com sinais clínicos inespecíficos e histórico de carrapatos. O diagnóstico foi confirmado por testes sorológicos, posterior PCR e sequenciamento (Gorna *et al.*, 2013). Depois, testes de imunofluorescência indireta na Itália, em 2014, detectaram soroprevalência de *A. phagocytophilum* em 4,5% (25/560) de gatos saudáveis e, dentre a população de 560, relatou-se que 3,75% (21/560) dos gatos haviam sido previamente infestados por carrapatos e dessa taxa, 14,28% (3/21) foram positivos nos testes (Ebani & Bertelloni, 2014).

Em 2015, nos Estados Unidos, realizou-se um estudo com patógenos felinos transmitidos por vetores (FVBP), onde no geral 7,8% (56/715) dos gatos eram sororreativos para FVBP e 3,2% (13/406) continham DNA de *Anaplasma* ou *Ehrlichia*. Sorologicamente, *A. phagocytophilum* obteve prevalência de 1,8% (13/715) e posteriormente, por meio de PCR e sequenciamento genético detectou-se 57,14% (4/7) de gatos positivos para o agente em questão (Hegarty *et al.*, 2015).

No território brasileiro, foi conduzido um estudo em 2017, onde detectou-se *A. phagocytophilum* em amostras sanguíneas de 66% (2/3) gatos testados por PCR, sendo que esses animais apresentavam alterações clínicas variadas, como prurido, diarreia, desidratação, icterícia e claudicação, além de alterações hematológicas sugestivas da infecção (André *et al.*, 2017). Posteriormente, o mesmo autor realizou novo estudo em 2022, nos estados de Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP), onde encontrou positividade geral de 7,4% das 390 amostras de sangue coletadas de animais sem sinais clínicos, além disso, relatou '*Candidatus Anaplasma amazonensis*' pela primeira vez em felinos (André *et al.*, 2022).

1.2 *Anaplasma platys*

Anteriormente denominada de *Ehrlichia platys* (Dumler *et al.*, 2001), esse agente infecta plaquetas e causa redução plaquetária por cerca de 7 a 10 dias, seguida por um período de recuperação e cursos cíclicos de alterações plaquetárias (Inokuma *et al.*, 2002). Sua patogenia não é bem elucidada, porém infere-se que o agente se adere na superfície plaquetária e adentra por endocitose, o que causa danos às plaquetas e gera trombocitopenia em consequência da

entrada e replicação do agente (Neer & Harrus, 2006). Posteriormente, as células infectadas são removidas da circulação sanguínea por sequestro esplênico e, por meio de mecanismos imunomediados ocorrem os episódios trombocitopênicos cíclicos (Neer & Harrus, 2006; Eddlestone *et al.*, 2007).

Portanto, na fase aguda da doença observa-se muitas plaquetas infectadas porém, com a multiplicação do agente há diminuição brusca na quantidade de plaquetas até que em torno de sete a quatorze dias após o primeiro episódio, inicia-se outra parasitemia com consequente trombocitopenia, estabelecendo o fator cíclico da enfermidade até que a fase crônica seja alcançada, onde ocorrem aparecimentos esporádicos do parasita e trombocitopenias mais leves (Hibler *et al.*, 1986; Woody & Hoskins, 1991).

Além disso, *A. platys* pode não ser patogênica, então, não causa manifestações graves nos hospedeiros, porém, dentre os sinais clínicos associados às suas detecções em gatos, estão: anorexia, letargia e infecções do trato urinário, além de trombocitopenia, linfopenia e anemia como achados hematológicos (Lima *et al.*, 2010; Qurollo *et al.*, 2014). O período de incubação varia de oito a quinze dias (Woody & Hoskins, 1991).

A primeira descrição de trombocitopenia infecciosa cíclica deu-se em 1978, em um cão dos Estados Unidos e, sua etiologia foi atribuída a um parasita que infectava exclusivamente plaquetas por meio de observação de inclusões plaquetária vistas na microscopia eletrônica (Harvey *et al.*, 1978)

Há poucos relatos sobre esse agente em gatos (Guimarães *et al.*, 2019), entretanto, *A. platys* foi descrita no estado de São Paulo, em 2005, no Brasil, por exame citológico de esfregaço sanguíneo em uma gata com histórico de atropelamento e manifestações clínicas de anorexia, depressão, palidez, anemia, leucocitose e trombocitopenia, onde observou-se mórulas em 7% das plaquetas (Santarém *et al.*, 2005). Posteriormente, o agente foi encontrado em Pernambuco, no ano de 2010 e a detecção foi por achado de mórulas nas plaquetas de um gato e, então, confirmou-se com PCR. O animal apresentava manifestações clínicas de anorexia, apatia, anúria, constipação e trombocitopenia (Lima *et al.*, 2010).

Na Tailândia, em 2012, foi detectado *Anaplasma platys* por meio da visualização de inclusões plaquetárias e posterior diagnóstico molecular por PCR em um gato doméstico naturalmente infectado. O animal apresentava manifestações clínicas de icterícia, anemia e trombocitopenia (Salakij *et al.*, 2012). Em 2014, nos Estados Unidos detectou-se *A. platys* por PCR, a partir do sangue de um gato diagnosticado com mieloma múltiplo, além da apresentação de sinais clínicos de azotemia, insuficiência mitral, osteoartrite e outras anormalidades

hematológicas como anemia, trombocitopenia, eosinofilia, hipoglicemia. Posteriormente, confirmou-se o resultado da PCR com o sequenciamento de DNA (Qurollo *et al.*, 2014).

Na Itália, em 2015, realizou-se testes moleculares em amostras sanguíneas de gatos e detectou que 31,1% (14/45) gatos foram positivos para a PCR específica para *A. platys* e, posteriormente, realizou-se sequenciamento e análise filogenética do DNA (Zobba *et al.*, 2015). Ainda em 2015, nos Estados Unidos foram realizados testes sorológicos em amostras de sangue de gatos, onde detectou-se que 3,2% (13/406) destes continham DNA de *Anaplasma* ou *Ehrlichia*. Sorologicamente, *A. platys* não foi detectado, porém, com posterior teste de PCR e sequenciamento detectou-se 23% (3/13) gatos positivos (Hegarty *et al.*, 2015).

1.3 Diagnóstico

Há vários métodos de diagnosticar hemoparasitos transmitidos por vetores, sendo os diretos: identificação de mórulas por microscopia ótica em esfregaços sanguíneos, isolamento do agente em culturas celulares e detecção de material genético do agente por PCR (Silaghi *et al.*, 2017). Já os métodos indiretos se baseiam na detecção de anticorpos específicos em soro por meio de técnicas como imunofluorescência indireta (IFA), *Western immunoblot* (WB) e ELISA (Carrade *et al.*, 2009).

No exame direto de microscopia ótica em espécies leucocitotrópicas como *A. phagocytophilum*, prefere-se esfregaços sanguíneos a partir da camada leucocitária do que as preparações com sangue total, pois em casos de leucopenia, poucas células infectadas seriam vistas (Silaghi *et al.*, 2017). Também usa-se essa camada para detecção de mórulas de *A. platys*, uma vez que essa parcela do sangue é enriquecida com plaquetas (Eddlestone *et al.*, 2007).

As culturas de células são importantes para comprovar a descoberta de espécies bacterianas, bem como dos aspectos taxonômicos (Zweygarth *et al.*, 2013). A cultura *in vitro* de *Anaplasma* spp. envolveu o uso de células de mamíferos que mimetizaram o ambiente intracelular de células hospedeiras naturais e, ocorreu primeiramente com *Anaplasma phagocytophilum* (Goodman *et al.*, 1996). Como alternativa às células de mamíferos, usou-se linhagens celulares de carrapatos (Massung *et al.*, 2007). Para realização da cultura, utiliza-se como inóculo amostras de sangue total anticoagulado, camada leucocitária ou tecidos e, periodicamente, deve-se adicionar meio de cultura fresco às células e realizar microscopia para detecção de qualquer crescimento bacteriano (Silaghi *et al.*, 2017).

Dentre os métodos indiretos, os testes sorológicos de ELISA e WB são capazes de detectar anticorpos, mas o método de eleição é a IFA (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*,

2009; Santos *et al.*, 2009). Porém, ainda assim, esse método apresenta desvantagens associadas a reações cruzadas, principalmente, entre espécies presentes no mesmo gênero, mas, tendo ênfase nas que ocorrem entre *A. phagocytophilum* e *E. canis* (Greig & Armstrong, 2006). Portanto, uma forma de aumentar a sensibilidade do teste é associar a técnica de IFA com a PCR, que é capaz de demonstrar a presença da infecção (Santos *et al.*, 2009). Dessa forma, a PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade na identificação de vetores e reservatórios do agente, pois permite detectar a infecção no período de pré-patência dos anticorpos e, possibilita diferenciar as espécies de *Anaplasma* por meio de posterior sequenciamento (Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015).

Portanto, o presente trabalho buscou avaliar a ocorrência molecular de *Anaplasma* spp. em gatos domésticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos testes foram utilizadas amostras de DNA previamente extraídas de amostras de sangue total de gatos, estas encontravam-se armazenadas a -20°C no biobanco do Laboratório de Investigação Etiológica Veterinária (LIVE Vet) da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras foram provenientes de atendimentos veterinários do Hospital Veterinário de Uberlândia (HV-UFU) e de clínicas e hospitais da região do triângulo mineiro, compreendendo o período de janeiro de 2020 a dezembro de 2022.

2.1 Diagnóstico

O teste de qPCR foi utilizado como método qualitativo para detecção de um fragmento do gene *groEL*, resultando em um produto com 456 pares de bases de comprimento. As sequências de primers usadas estão descritas na Tabela 1. A reação de qPCR foi preparada com 1× Gota® qPCR Master Mix (Prometa, EUA), 500 nM de cada primer, 2,0 µL de DNA extraído e água nuclease free q.s.p. 20 µL. Para controle negativo utilizou-se água ultrapura nuclease free no lugar da amostra, enquanto o controle positivo foi instituído com uso de amostra positiva previamente estabelecida. As condições de ciclagem térmica foram: 95°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 52,7 °C por 60 segundos, seguindo de uma ciclagem para a curva de melting usando o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemanha). As amostras consideradas positivas apresentaram um único pico na curva de melting correspondente a 79°C, além de amplificação no ciclo de quantificação. A presença de inibidores de PCR nas amostras de DNA foi excluída pela amplificação de um fragmento do gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) nas amostras, sendo o controle endógeno (Birkenheuer *et al.*, 2003).

Tabela 1 – Primers utilizados na reação de PCR em tempo real para a detecção de *Anaplasma* spp.

Identificação	Sequência (5' – 3')	Referência
Primer F – Anap (Forward)	TTATCGTTACATTGAGAAGC	Benevenuto <i>et al.</i> , (2017)
Primer R – Anap (Reverse)	GATATAAAGTTATTAAGTATAAAGC	

Fonte: A autora.

3 RESULTADOS

Foram analisadas 269 amostras de sangue total de gatos domésticos do biobanco do Laboratório de Investigação Etiológica Veterinária, todas positivas no controle endógeno. Informações sobre sexo, raça, idade e teste para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) foram compiladas. Com relação ao gênero, 52,41% (41/269) dos gatos eram fêmeas e 47,21% (127/269) machos. Dentre as raças encontradas, 89,9% (242/269) eram classificados como sem raça definida (SRD), 7,06% (19/269) persas, 1,48% (4/269) siameses, 1,41% (3/269) não informaram a raça e 0,37% (1/269) Maine coon.

Os intervalos de idade adotados foram: filhotes, com até 12 meses, jovens adultos, tendo entre 1 e 6 anos, adultos, tendo entre 7 e 10 anos e idosos, com idade superior a 10 anos (Quimby, 2021). A população estudada foi composta predominantemente por animais filhotes e adultos jovens (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos gatos com base na faixa etária

Classificação	Intervalo de faixa etária	Porcentagem e número de animais
Filhotes	0 – 12 meses	31,6% (85/269)
Jovens adultos	1 – 6 anos ou 12 – 72 meses	59,10% (159/269)
Adultos	7 – 10 anos ou 84 – 120 meses	5,57% (15/269)
Idosos	Superior a 10 anos ou 120 meses	3,72% (10/269)

Fonte: A autora.

O *status* para FIV e FeLV foi analisado por PCR em 88,85% (239/269) dos gatos, com 28,87% (69/239) dos animais testados positivos para pelo menos um dos retrovírus (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização para imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) por PCR em gatos domésticos

<i>Status</i>	Porcentagem e número de animais
FIV e FeLV (-)	49,81% (134/269)
FIV (-) e FeLV (+)	17,1% (46/269)
FeLV (-)	12,63% (34/269)
FeLV (+)	5,2% (14/269)
FIV e FeLV (+)	1,85% (5/269)
FIV (+) e FeLV (-)	1,48% (4/269)
FIV (-)	0,74% (2/269)

Fonte: A autora.

Não foi detectada a presença de material genético de *Anaplasma* spp. em nenhuma das amostras avaliadas por qPCR.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve a ausência de ocorrência de espécies de *Anaplasma* em gatos da região do triângulo mineiro, o que coincide com pesquisas clínicas do assunto sobre a anaplasmose felina ser uma doença relativamente rara, existindo, portanto, poucos relatos específicos de casos em gatos domésticos (Pennisi *et al.*, 2017; Shäffer & Kohn, 2020).

Majoritariamente, os testes realizados com elevado número de amostras (n amostral) demonstraram poucas informações sobre dados epidemiológicos, como constatado nos estudos conduzidos nos Estados Unidos, Itália, Alemanha e Brasil, que avaliaram contingentes de 93, 250, 460, 632, 715 e 390 amostras, respectivamente. Sendo assim, nestas pesquisas as informações sobre sexo, raça, idade e status para FIV e FeLV não foram correlacionadas com possíveis infecções por *Anaplasma* (Magnarelli *et al.*, 2005; Tarello, 2005; Billeter *et al.*, 2007; Hamelet *et al.*, 2012; Hegarty *et al.*, 2015; André *et al.*, 2022). O presente estudo utilizou n amostral de 269 e essas informações foram coletadas, porém, não foi possível a correlação com infecções pelo patógeno.

Outro ponto importante associado é o fato da dificuldade de coletar informações sobre certas amostras, como expresso no trabalho realizado nos Estados Unidos, em 2007, onde a população observada era em sua maioria pertencentes a organizações de resgate ou eram animais em situação de rua, portanto sem histórico de dados para a pesquisa (Billeter *et al.*, 2007). O atual trabalho utilizou amostras de animais atendidos pelo HV-UFU, clínicas e hospitais do triângulo mineiro, portanto semelhante ao exposto, algumas informações sobre ambiente e histórico não puderam ser esclarecidas.

Com relação às informações sobre a idade dos animais testados, as pesquisas analisadas não estabelecem correlação com esse dado e a infecção por *Anaplasma*, sendo assim, foram relatados casos em animais majoritariamente jovens adultos, entre 1 e 3 anos (Bjoersdorff *et al.*, 1999; Lappin *et al.*, 2004; Heikkila *et al.*, 2010; Gorna *et al.*, 2013; André *et al.*, 2017). No presente estudo, foram avaliados animais de diversas faixas etárias, com predomínio de jovens adultos contendo de 1 a 6 anos. Ademais, cita-se que os intervalos de idade descritos são muito abrangentes nas pesquisas onde a população testada é considerada grande, como em estudos na Espanha que incluíram gatos de 1 mês até 21 anos e que também predominaram a faixa etária de jovens adultos (Solano *et al.*, 2006; Áyllon *et al.*, 2012).

O status para FIV e FeLV foi levado em consideração como dado epidemiológico em várias das pesquisas consultadas, como naquelas desenvolvidas na Suécia, Estados Unidos, Espanha e Polônia, sendo assim, em sua maioria, os animais eram negativos para ambas as

infecções por meio de teste *point of care* (POC), porém, no trabalho em território espanhol, 2,12% (2/94) das amostras foram positivas para FIV e FeLV, além disso, no mesmo país, em 2012, uma pesquisa relatou 5,13% (26/506) de positividade para FIV e 7,14% (36/504) para FeLV nos animais testados (Bjoersdorff *et al.*, 1999; Lappin *et al.*, 2004; Solano *et al.*, 2006; Áyllon *et al.*, 2012; Gorna *et al.*, 2013). De maneira geral, não foram feitas correlações entre os animais testados para anaplasiose e FIV e FeLV, porém devido à característica imunossupressora desses retrovírus, é importante que em pesquisas de hemoparasitos, esses vírus também sejam avaliados.

Nas pesquisas analisadas, algumas trouxeram dados sobre o ambiente e consequente comportamento dos gatos como domiciliados, semi-domiciliados e com relato de exposição a carrapatos, como é referido na Suécia, Finlândia e Polônia. Portanto, as pesquisas citam, respectivamente, um relato de caso de gato com acesso à rua e histórico de ectoparasitas, o caso de uma gata pós viagem a local com acesso ao ar livre e observação de carrapatos além do relato de caso de um gato semi-domiciliado com ectoparasitas (Bjoersdorff *et al.*, 1999; Heikkilä *et al.*, 2010; Gorna *et al.*, 2013). O mesmo fato foi notado em pesquisas com maior n amostral, como foi visto na Espanha, onde relatou-se, respectivamente, que 49,3% (247/501) dos gatos possuíam acesso à rua e em 7,7% (34/440) foram observados carrapatos, enquanto na Itália, em 3,75% (21/560) dos animais foi relatada exposição a ectoparasitas (Áyllon *et al.*, 2012; Ebani & Bertelloni, 2014).

Os carrapatos estão envolvidos na transmissão de vários agentes patogênicos, dentre eles as bactérias da família Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001). Ao analisar a transmissão desse patógeno aos felinos, pode-se inferir que esta espécie é menos exposta ou suscetível aos vetores quando comparados aos cães (Lappin *et al.*, 2004; Eberhardt *et al.*, 2006). Outro fator importante diz respeito ao comportamento de auto-limpeza dos gatos, o que pode ocasionar a remoção mecânica de possíveis ectoparasitas (Gorna *et al.*, 2013).

A detecção de *A. phagocytophilum* nos gatos em alguns relatos na Suécia, Itália, Finlândia e Alemanha foi instituída por exame citológico de esfregaços sanguíneos (Bjoersdorff *et al.*, 1999; Tarello, 2005; Heikkilä *et al.*, 2010; Hamel *et al.*, 2012). Outros resultados foram obtidos através de imunofluorescência indireta ou ELISA, como em estudos desenvolvidos nos Estados Unidos, Espanha e Itália (Magnarelli *et al.*, 2005; Solano *et al.*, 2006; Ebani & Bertelloni, 2014; Hegarty *et al.*, 2012). No presente estudo não foi realizada sorologia, além disso, pesquisas indicam que altas taxas de soroprevalência de anticorpos anti – *Anaplasma phagocytophilum* não se correlacionam positivamente com as detecções do patógeno por métodos diagnósticos diretos (Hamel *et al.*, 2012).

Outro fator destaque é com relação aos estudos que utilizaram dois métodos diagnósticos, indiretos e diretos, que obtiveram positividade para anticorpos em soro sanguíneo e negatividade em PCR como nos Estados Unidos e Espanha (Billeter *et al.*, 2007; Áyllon *et al.*, 2012). Portanto, de mesma forma, no presente estudo não foram detectadas amostras positivas pelo método de PCR, além de que métodos indiretos não foram aplicados na pesquisa. Isto pode ter relação com o fato de o organismo conseguir manter outros tecidos com infecção persistente, como o baço, portanto seria a amostra ideal para testagem (Harrus *et al.*, 1998).

Para *Anaplasma platys*, a maioria das descrições são por relatos de casos, como os conduzidos no Brasil, Tailândia e Estados Unidos (Santarém *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010; Salakij *et al.*, 2012; Qurollo *et al.*, 2014), havendo poucas pesquisas realizadas com biobanco como a do presente estudo. Além disso, nas referências citadas, os relatos se deram por meio de teste citológico de esfregaço sanguíneo e posterior PCR, não sendo, portanto, somente por meio do teste molecular como este.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo buscou contribuir para o conhecimento da circulação de *Anaplasma* spp. em gatos domésticos do triângulo mineiro por meio de análises moleculares em amostras sanguíneas. Tendo em vista os objetivos delineados para esta pesquisa, eles foram alcançados mesmo que sem a observação de animais positivos, além disso, evidencia-se a necessidade de estudos sorológicos e moleculares para detecção da prevalência de doenças transmitidas por vetores na população felina, além de aumentar o contingente de estudos que caracterizem manifestações clínicas e patológicas destas doenças em gatos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTI, A., & SPARAGANO, O. A. E. Molecular Diagnosis of Granulocytic Anaplasmosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia by PCR-RFLP. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 371–378, 2006.
- ANDRÉ, M.R *et al.* Molecular Detection of Tick-Borne Agents in Cats from Southeastern and Northern Brazil. **Pathogens**. v. 11, p. 106, 2022.
- ANDRÉ, M.R *et al.* Co-infection with arthropod-borne pathogens in domestic cats. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 26, n. 4, p. 525–531, 2017.
- ASSI, M.A *et al.* Lyme disease followed by human granulocytic anaplasmosis in a kidney transplant recipient. **Transpl Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 66-72, 2007.
- AYLLÓN, T *et al.* Vectorborne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v. 12, p. 143–149, 2012.
- BENEVENUTE, J.L *et al.* Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using groEL gene for Ehrlichia and Anaplasma species in rodents in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 4, p. 646-656, 2017.
- BEAUFILS, J. P *et al.* Ehrlichiose probable chez le chat: etude retrospective sur 21 cas. **Pratique Médecine Chir Animal Compagnie**, n.34, p.587-596, 1999.
- BILLETER, S.A *et al.* Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. **Vet Parasitol.** v. 147, p. 194–198, 2007.
- BIRKENHEUER A. J *et al.* “Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype) and B. canis DNA in Canine Blood Samples,” **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.
- BJOERSDORFF, A *et al.* Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. **J Small Anim Pract.** v. 40, p. 20–24, 1999.
- BJOERSDORFF A. Ehrlichiosis and anaplasmosis, part 2: *Anaplasma phagocytophilum* comb. nov. infection. In: Shaw S and Day M (eds). Arthropod- borne infectious diseases of the dog and the cat. **London: Manson Publishing**, p.120–133, 2005.
- CAMPBELL, R.S.F. Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial. **Vet. Bull.**, v. 64, p. 1-24, 1994.
- CARLYON J.A & FIKRIG E. Mechanism of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. **Curr Opin Hematol**, v.13, p. 28–33, 2006.
- CARRADE, D.D *et al.* Canine granulocytic anaplasmosis: A review. **J Vet InternMed**, v. 2, n. 6, p. 1129-1141, 2009.
- DAY, MJ. One health: The importance of companion animal vector-borne Diseases. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 49, 2011.

DINIZ, P.P. & BREITSCHWERDT, E.B. *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis) In: **Greene infectious Diseases of the Dog and Cat**, 4^a ed, p. 244-254, Elsevier Saunders, 2012.

DUMLER, J.S *et al.* 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*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p. 2145–2165, 2001.

EBANI, V.V & BERTELLONI F. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Central Italian healthy domestic cats. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 5, p. 668–671, 2014.

EBERHARDT, J.M *et al.* Prevalence of infectious disease agents in cats from Arizona. **J. Feline Med. Surg.** v.8, n.3, p. 164–168, 2006.

EDDLESTONE, S.M *et al.* PCR Detection of *Anaplasma platys* in Blood and Tissue of Dogs during Acute Phase of Experimental Infection. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 205–10, 2007.

FOLEY J.E *et al.* Evidence for modulated immune response to *Anaplasma phagocytophilum* *sensu lato* in cats with FIV-induced immunosuppression. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 26, p. 103–113, 2003.

FOLEY, Janet *et al.* Co-phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and its vectors, *Ixodes* spp. ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 45, p. 155-170, 2008.

FREIRE, Paulo. Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre. **Ciências**, v. 14, p. 15.

GARCIA-GARCIA J.C *et al.* Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector Anka of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. **Infect Immun**, v.77, p. 2385–2391, 2009.

GOODMAN J.L *et al.* Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. **N Engl J Med**, v. 334, p. 209–215, 1996.

GOODMAN J.L *et al.* Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. **J Clin Invest**, v.103, p. 407–412, 1999.

GORDON, W.S *et al.* Tick-Borne Fever: A Hitherto Undescribed Disease of sheep. **J comp pathol**, v. 45, p. 301–307, 1932.

GORNA, M *et al.* Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in a cat. **Vet Med-Czech**. v. 58, p. 39–43, 2013.

GORTÁZAR, C *et al.* Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. **Eur J Wild Res**, v. 53, p. 241-256, 2007.

- GRANICK, J.L *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). **J Am Vet Med Assoc**, v. 234, n. 12, p. 1559–1565, 2009.
- GREIG, B. & ARMSTRONG, P.J. Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In **Greene infectious diseases of the Dog and Cat**. 3^a ed, p. 219–224, Elsevier Saunders, 2006.
- GUIMARÃES, A *et al.* Ehrlichia spp. infection in domestic cats from Rio de Janeiro State, southeast Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 28, 180–185, 2019.
- HAMEL, D *et al.* Seroprevalence and bacteremia of *Anaplasma phagocytophilum* in cats from Bavaria and Lower Saxony (Germany). **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.** v. 125, p. 163–167, 2012.
- HARVEY, J.W *et al.* Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. **J Infect Dis.** v.137, p. 182–188, 1978.
- HARRUS, S *et al.* Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 62, p. 15–27, 1998.
- HEIKKILÄ, H.M *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: case report. **Acta Vet Scand.** v.52, p. 62, 2010.
- HEGARTY B.C *et al.* Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasit Vectors.** v.8, p. 320, 2015.
- HIBLER, S *et al.* Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **The Compendium On Continuing Education for the Practicing Veterinarian.** v.8 n.2 p.106-114, 1986.
- HODZIC, E *et al.* Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 12, p. 3574–3578, 1998.
- INOKUMA, H *et al.* Determination of the Nucleotide Sequence of Heat Shock Operon *groESL* and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1132-1136, 2002.
- INOKUMA, H. Vectors and Reservoir Hosts of Anaplasmatidae. **Rickettsial Diseases**, p. 199 – 212, 2007.
- KOHN, B. *et al.* Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, n. 6, p. 1289-1295, 2008.
- LAPPIN, M. R. Feline ehrlichiosis and hemobartonellosis. In: **World Small Animal Veterinary Association World Congress**. Anais. Vancouver, 2001.
- LAPPIN, M.R *et al.* Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats of North America. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** V. 225, n. 6), p. 893–896, 2004.

- LAPPIN, M.R *et al.* Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* infection in cats after exposure to wild-caught adult *Ixodes scapularis*. **J.Vet. Diagn. Invest.** v. 27, p. 522–525, 2015.
- LEBLOND, A *et al.* An Epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in Southern France. **Vet Sci Tech**, v. 24, n. 3, p. 899-908, 2005.
- LIMA, M.L.F *et al.* Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v. 41, p. 381–385, 2010.
- MAGNARELLI, L.A *et al.* Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. **Am J Vet Res.** v. 66, p. 1895–1899, 2005.
- MASSUNG R.F *et al.* Isolation and propagation of the AP-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 2138–2143, 2007.
- MUNDERLOH, U.G *et al.* Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginal* and *A. phagocytophilum*. **Vet Microbiol**, v.101, n. 1, p. 53–64, 2004.
- NEER, T. M. & HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis and neorickettsiosis. In: **Greene infectious Diseases of the Dog and Cat**. Elsevier Saunders, 2006.
- NICHOLSON, W.L *et al.* The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs in people. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 4, p. 205-12, 2010.
- NOVÁKOVÁ, M. & VICHOVÁ, B. Granulocytic anaplasmosis- emerging tick- borne disease of humans and animals. **Biologia**, v. 65, p. 925-931, 2010.
- PENNISI, M.G *et al.* *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. **J. Feline Med.Surg.** v. 19, p. 542–548, 2017.
- POPOV, V.L *et al.* Ultrastructural differentiation of the geno groups in the genus *Ehrlichia*. **J Med Microbiol**, v.47, p. 235–251, 1998.
- QUIMBY, J *et al.* AAHA/AAFP feline life stage guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 3, p. 211-233, 2021.
- QUROLLO, B.A *et al.* Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma. **J Feline Med Surg.** v.16, p. 713–720, 2014.
- RENNEKER, S *et al.* Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any longer? **Transbound. Emerg. Dis.** v. 60, p. 105–112, 2013.
- RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 95–101, 2006.
- ROBERTS, R.B & SOAVE, R. Emerging pathogens associated with tick-borne infections. **Braz. J. Infec. Dis.**, v. 1, p. 17-26, 1997.

- SAINZ, Á *et al.* Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 75, 2015.
- SALAKIJ, C *et al.* Molecular characterization of *Anaplasma platys* in a domestic cat from Thailand. **Comp. Clin. Pathol.** v. 21, p. 345–348, 2012.
- SANTARÉM, V.A *et al.* Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Colloq. Agrar.** v.1, n. 2, p. 60–66, 2005.
- SANTOS, A.S *et al.* Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infections in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. **Vet Rec**, v. 164, n. 6, p.168-71, 2009.
- SANTOS, A.S *et al.* PCR-based survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 2009.
- SANTOS, H.A *et al.* First report of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from Brazil detected by real-time PCR. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 23, p. 770–774, 2011.
- SHÄFFER, I & KOHN, B. *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats: a literature review to raise clinical awareness. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v. 22, p. 428–441, 2020.
- SHIELDS, K *et al.* Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: A case report. **Transfus**, v. 55, n. 4, p. 719- 25, 2015.
- SILAGHI, C *et al.* Investigations on the relationship of molecular and clinical findings of *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. **J Clin Microbiol.** v. 12, n. 49, p. 4413-4414, 2011.
- SILAGHI, C *et al.* Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2017.
- SILVEIRA, J.A.G *et al.* The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Brazilian dog. **Ticks and Tick- Borne Dis**, v. 6, n. 3, p. 242- 245, 2015.
- SOLANO-GALLEGO, L *et al.* Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. **Vet Microbiol.** v. 118, p. 274–277, 2006.
- STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum* - The Most Widespread Tick-Borne Infection in Animals in Europe. **Vet Res Commun**, v. 31, p. 79-84, 2007.
- TARELLO, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. **Veterinary record**, v. 156, n. 24, p. 772- 774, 2005.
- WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Vet Parasitol**, v. 167, n. 2-4, p. 108- 122, 2010.
- WOODY, B.J & HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **J. Small Anim.Pract.**v. 21, p. 75–98, 1991.
- ZOBBA, R *et al.* Cell tropism and molecular epidemiology of *Anaplasma platys*-like strains in cats. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 3, p. 272-280, 2015.

ZWEYGARTH, E *et al.* In vitro culture of a novel genotype of *Ehrlichia* sp. From Brazil. **Transbound Emerg Dis**, v. 60, p. 86-92, 2013.