

INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis* E *Anaplasma platys* EM CADELAS E NEONATOS DE CUIABÁ, MATO GROSSO

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida¹, Daphine Ariadne Jesus de Paula¹,
Valéria Dutra¹, Luciano Nakazato¹, Adriane Jorge Mendonça¹,
Valéria Régia Franco Sousa¹

¹ Universidade Federal do Mato Grosso - arleferreira@gmail.com

RESUMO: Os canídeos podem ser infectados por diversos agentes pertencentes à Família Anaplasmataceae dentre os mais comumente relatados encontram-se *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, causando a ehrlichiose monocítica canina e a trombocitopenia infecciosa cíclica canina, respectivamente. O diagnóstico pode ser feito pela detecção de mórulas em esfregaço sanguíneo, sorologicamente, pelo isolamento, com exceção de *A. platys* e pelos métodos moleculares, como a PCR. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a presença de infecção por *E. canis* e *A. platys* em cães neonatos e suas respectivas mães. Durante o período de junho a dezembro de 2006, foram avaliados clinicamente 21 fêmeas híguas e 40 filhotes de suas respectivas ninhadas com idade entre cinco a 29 dias de idade. Para a avaliação da infecção por *E. canis*, realizaram-se análise sorológica com o ensaio SNAP 3DX, observação de mórulas em esfregaço sanguíneo e *nested* PCR e para *A. platys*, a *nested* PCR. Dos 61 animais avaliados, 36 (59%) apresentaram-se positivos para *E. canis* e 16 (26,2%) para *A. platys*. Infecção isolada por *A. platys* e co-infecção com *E. canis* foi observada em cinco (13,8%) e 11 (30,5%) cães, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa ($P=0,63$). Com os dados obtidos pela técnica da *nPCR* conseguiu-se detectar infecção por *E. canis* e *A. platys* em neonatos e suas respectivas mães, levantando a possibilidade de transmissão transplacentária, entretanto estudos mais aprofundados devem ser realizados para se confirmar tal aspecto, principalmente em áreas endêmicas para a doença.

Palavras-chave: cães jovens; ehrlichiose monocítica; *nested* PCR; trombocitopenia cíclica

INFECTION WITH *Ehrlichia canis* AND *Anaplasma platys* IN BITCHES AND PUPPIES IN THE CUIABA, MATO GROSSO

ABSTRACT: The dogs can be infected by different agents belonging to the Family Anaplasmataceae among the most commonly reported are *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys*, causing monocytic ehrlichiosis and canine infectious cyclic thrombocytopenia in dogs, respectively. The diagnosis can be made by detection of morulae in blood, serologically, by isolation, with the exception of *A. platys* and by molecular methods such as PCR. The aim of this study was to evaluate the presence of infection by *E. canis* and *A. platys* in dogs' newborns and their mothers. During the period from June to December 2006 were clinically evaluated 21 healthy females and 40 puppies of their respective litters with five to 29 days old. For the assessment of infection by *E. canis* were held with the serologic test SNAP 3DX, observation of morulae in sanguine smear and nested PCR for *A. platys* and the nested PCR. Of the 61 animals evaluated, 36 (59%) were positive for *E. canis* and 16 (26,2%) for *A. platys*. Isolated infection by *A. platys* and co-infection with *E. canis* was observed in five (13,8%) and 11 (30,5%) dogs, respectively, with no statistically significant difference ($P=0,63$). With the data obtained by the technique of *nPCR* was able to detect infection by *E. canis* and *A. platys* in puppies and their mothers, raising the possibility of transplacental transmission, however further studies should be performed to confirm this aspect, particularly in areas endemic for the disease.

Key Words: cyclic thrombocytopenia; monocytic ehrlichiosis; nested PCR; puppies

INTRODUÇÃO

Os canídeos podem ser infectados por diversos agentes pertencentes à Família Anaplasmataceae, como a *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma platys* e *A. phagocytophilum* (Dagnone, 2006). Dentre estas, as mais comumente relatadas promovendo infecção canina são *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* (Sousa et al., 2009).

A ehrlichiose monocítica canina (EMC) é uma doença potencialmente fatal, causada por *Ehrlichia canis*, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Rodríguez-Vivas et al., 2005). A ehrlichiose foi primeiramente descrita na Argélia em 1935, mas atualmente tem distribuição nos diversos continentes, afetando comumente cães em áreas de clima quente (Cohn, 2003) e considerada endêmica em muitas regiões (Santos et al., 2009). A transmissão vetorial é relatada, sendo a presença de cães infectados necessário para a permanência de *E. canis*. Assim, a incidência de infecção está intimamente relacionada a abundância do vetor (Trapp et al., 2006). No Brasil, o *R. sanguineus* é o principal vetor nas áreas urbanas, sendo este bem adaptado ao ambiente doméstico, entretanto pouco se conhece sobre a transmissão em áreas rurais onde carrapatos do gênero *Amblyomma* são encontrados com maior frequência que o *R. sanguineus* (Labruna et al., 2007).

Anaplasma platys foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1978, (Harvey et al.) e, posteriormente, no Japão (Inokuma et al., 2001). Esse agente infecta especificamente plaquetas de cães e causa uma doença denominada trombocitopenia infecciosa cíclica canina, com diminuição de plaquetas persistindo por sete a 10 dias, seguida por um período de recuperação.

Ocorrem, então, cursos cíclicos de alterações plaquetárias (Inokuma et al., 2002). A detecção de carrapatos do gênero *R. sanguineus* infectados com *A. platys* sugere ser este o vetor (Hoskins, 1991; Motoi et al., 2001).

Na EMC o período de incubação varia de oito a vinte dias, acompanhado da forma aguda, subclínica ou crônica a depender da resposta imune do hospedeiro (Rikihisa, 1991). A resposta imune humoral induz a produção de anticorpos que pode permanecer por anos (Waner et al., 2001), podendo estes anticorpos ser transferidos passivamente para os cães neonatos ao ingerirem o colostro (Tizard, 2002).

A despeito da produção de anticorpos alguns cães falham em eliminar o microorganismo, induzindo ao estado de portador assintomático ou cronicamente sintomático, fato comum a infecção por vários agentes rickettsiais, como a *E. canis*. A produção de IgA e IgM se inicia em torno de quatro a sete dias na infecção por *E. canis* (Waner et al., 2001), enquanto IgG é detectada em 15 dias (Hess et al., 2006). No entanto, uma resposta imune humoral eficiente, isto é, com altos títulos de anticorpos, em alguns casos está relacionada a complicações graves na patogênese da doença e não a proteção (Harrus et al., 1999).

O diagnóstico destas afecções pode ser feito pela detecção de mórulas em esfregaço sanguíneo (Elias, 1991; Inokuma et al., 2002), sorológico como a imunofluorescência indireta e dot-ELISA, na EMC, sendo o último de fácil aplicabilidade em hospitais e clínicas veterinárias. Ainda pode ser realizado isolamento em laboratório, porém requer o uso de culturas celulares fato que eleva o custo e demanda técnica apropriada. Entre os métodos moleculares, o Western blot, real-time

Tabela 1 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e "nested" PCR, bem com a descrição dos tamanhos dos amplicómeros e seqüência térmica.

Agentes	Seqüência de oligonucleotídeos (5' → 3')	Amplicómero (pb ¹)	Seqüência Térmica
<i>Ehrlichia</i> spp			
-ECC	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'	458	94°C/3' 30 ciclos: 94°C/1'; 65°C/2'; 72°C/2' 72°C/5'
-ECB	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'		
<i>E. canis</i>			
-ECAN	5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAG-3'	398	2 ciclos: 94°C/1'; 55°C/2'; 72°C/90"
-HE3	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT-3'		37 ciclos: 92°C/1'; 55°C/2'; 72°C/90" 72°C/5'
<i>A. platys</i>			
-Platys F	5'-AAGTCGAACGGATTTTTGTC-3'	504	94°C/5' 40 ciclos: 95°C/30"; 60°C/30"; 72°C/90" 72°C/5'
-Platys R	5'-CTTTAACTTACCGAACC-3'		

¹ - pares de base

PCR (Hergarty et al., 1997; Baneth et al., 2009), bem como o PCR e o *nested* PCR, técnicas diagnósticas com alta sensibilidade e especificidade para detectar *E. canis* e *A. platys* em amostras sanguíneas tanto de cães infectados experimental ou naturalmente, especialmente durante a fase aguda da doença (Wen et al., 1997; Huang et al., 2005, Santos et al., 2009).

A imunopatogênese da infecção por *E. canis* e *A. platys* ainda é pouco conhecida (Waner et al., 2001), assim como a transmissão vertical, necessitando de estudos para melhor compreensão principalmente em cães jovens. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de anticorpos e DNA de *E. canis* e *A. platys* em cães neonatos e suas respectivas mães.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de junho a dezembro de 2006, no Setor de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso,

foram avaliados clinicamente 21 fêmeas hípidas e 40 neonatos de suas respectivas ninhadas com idade entre cinco a 29 dias de idade.

Após a avaliação clínica detalhada, foram colhidas amostras sanguíneas de um a dois filhotes de cada ninhada, selecionados aleatoriamente, além de amostra da mãe. As amostras se destinaram para sorologia e para extração de DNA.

As amostras de sangue foram testadas para ehrlichiose monocítica canina com o ensaio SNAP 3DX (IDEXX Laboratório) de acordo com a recomendação do fabricante.

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen[®]), conforme instruções do fabricante. Este DNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

Os oligonucleotídeos utilizados para a primeira etapa de amplificação para o gênero *Ehrlichia* foram ECC e ECB e no *nested* PCR para amplificação da espécie *E. canis* foram ECAN e HE3, que amplificam fragmentos de 458 e

398 pares de bases, respectivamente (Murphy et al., 1998) (Tabela 1).

A primeira etapa de amplificação (PCR) para o gênero *Ehrlichia* foi realizada utilizando-se uma reação de volume total de 25 μ L, com uma mistura contendo 10 μ L de DNA-amostra (~ 1 μ g de DNA); 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U de Taq DNA polimerase recombinante, Tampão de PCR 10X e água ultra-pura qsp.

Nested PCR para a espécie *E. canis*, foi realizada com as mesmas condições da PCR, exceto que o DNA-amostra foi de 1,0 μ L do produto amplificado da PCR. Para o *nested PCR* de *Anaplasma platys*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores denominados Platys-F e Platys-R, os quais amplificam um amplicómero de aproximadamente 504 pares de bases (Inokuma et al., 2002) (Tabela 1).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em Gel de Agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo.

Para a análise estatística dos resultados obtidos, foram utilizados o teste do Qui-Quadrado e Teste Exato de Fischer, através do programa Epi info versão 3.3.2., tendo sido considerados significativos os resultados com onde $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Dos animais testados 36 (59%) foram positivos para *E. canis* e 16 (26,2%) para *A. platys* totalizando 41 (67,2%) cães com a infecção por um ou ambos agentes.

Os cães sem raça definida representaram 42,6% (26) do estudo, sendo que outras raças também participaram, como rottweiler, boxer, cocker spainel, poodle, bull terrier, akita, american pit bull, pinscher e schnauzer

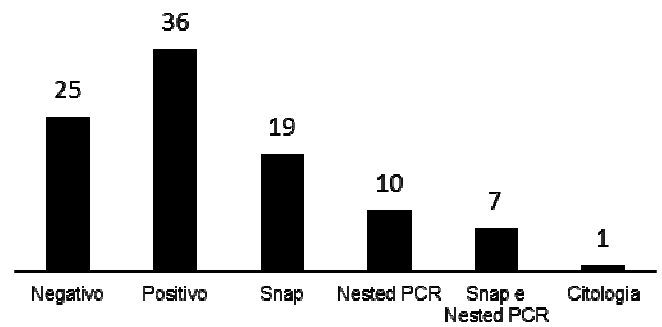


Figura 1 - Cães com infecção por *Ehrlichia canis* diagnosticados por pesquisa em esfregaço sanguíneo, dot ELISA e *nested PCR*

miniatura. Dentre os positivos para os dois agentes 20 (48,8%) eram SRD, seis (14,6%) boxer, quatro (9,7%) rottweiler e três (7,3%) pinscher. As raças cocker, american pit bull e poodle compunham dois (4,9%) membros cada e schnauzer um (2,4%). Quanto ao sexo dos quarenta filhotes, 23 machos e 17 fêmeas, sendo 16 (69,6%) machos e 12 (70,6%) fêmeas positivas, sem diferença estatisticamente significativa.

No estudo da EMC nos diferentes métodos diagnósticos utilizados em dezenove animais (52,8%) se verificaram exclusivamente a presença de anticorpos contra *E. canis*, sendo o número de positivos em cada método diagnóstico inserido na Figura 1.

Os filhotes em que as mães possuíam anticorpos para *E. canis* também encontravam-se com títulos para o agente, sendo que nove filhotes de um total de 11 houve amplificação de DNA, sem ocorrer nas suas respectivas mães. O Dot-Elisa detectou anticorpos em 27 (44,3%) animais, enquanto na análise citológica do esfregaço sanguíneo em apenas um (1,6%) filhote foi visualizada mórula de *Ehrlichia* sp.

A amplificação de DNA incidiu em dez (27,8%) animais, e em sete houve detecção de anticorpos e de DNA ehrlichial. A amplificação de DNA pelo *nested PCR* com *primer* específico para *E. canis*, se deu em seis mães e 11 filhotes. Na pesquisa da EMC não foi

observada diferença estatisticamente significativa ao analisar a técnica de citologia e *nested* PCR com o Dot-ELISA, considerado padrão-ouro ($P>0,05$).

No presente estudo foi encontrada infecção isolada por *A. platys* e co-infecção com *E. canis* em cinco (13,8%) e 11 (30,5%) cães, respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa ($P=0.63$).

DISCUSSÃO

A prevalência de *E. canis* e *A. platys* é altamente dependente da distribuição do vetor *R. sanguineus*, de grande ocorrência no Brasil (Hoskins, 1991; Labruna e Pereira, 2001), país com diversas áreas tropicais onde a condição ambiental permite a sobrevivência do vetor (Cocco et al., 2003). A prevalência da infecção por ambos agentes são similares aos encontrados por Sousa e Almeida (2006), Huang et al. (2005) e Santos et al. (2009) em estudos realizados no Brasil e na Venezuela.

Estudos apontam não haver predisposição racial ou sexual para a infecção (Harrus et al., 1997), no entanto, parece haver diferença quanto à resposta imune a doença, o que induziria as manifestações clínicas mais graves em algumas raças. Um estudo realizado por Jiménez – Coelho et al. (2008) em cães sem raça definida, sugere o desenvolvimento de uma resistência destes animais a infestação por carrapatos, infecção por ehrlichia, e outros agentes ehrlichiais, devido a menor exposição ao *R. sanguineus* nas ruas, pois são parasitos bem adaptados a ambientes internos.

Em dezenove animais (52,8%) se verificou exclusivamente a presença de anticorpos contra *E. canis*. A ocorrência destes animais pode indicar estado de portador ou de tratamento pregresso para as mães (Nakaghi et al., 2008), no

entanto para os filhotes acredita-se ser decorrente da transferência passiva de anticorpos maternos. A presença de resposta imune humoral não está diretamente relacionada a proteção dos filhotes, pois alguns estudos demonstram que animais com altos títulos de anticorpos apresentam a doença com maior severidade clínica (Waner et al., 2001).

A partir da sorologia dos filhotes com o dot-ELISA para infecção por *Ehrlichia canis*, verificou que os filhotes mais velhos apresentavam menor reação, justificado pelo declínio na concentração de anticorpos com o avançar dos dias. O encontro de filhotes com detecção de DNA de *Ehrlichia canis* sem ocorrer nas respectivas mães pode ser explicado pelas mães poderem se encontrar na fase crônica da doença onde o agente pode não ser mais encontrado no sangue circulante, proporcionando resultado negativo na PCR (Nakaghi et al., 2008) ou uma possível eliminação do agente pelas mesmas (Waner et al., 2001). Entretanto, a possibilidade de aquisição vetorial da bactéria pelos filhotes é aspecto que tem que ser levado em consideração, apesar de em apenas quatro (10%) filhotes terem sido encontrados o carrapato *R. sanguineus*, a ocorrência de infestação anterior ao momento da consulta e coleta das amostras pode ser cogitado tendo em vista a inobservância pelo proprietário.

Métodos com princípios diferentes podem ser utilizados no diagnóstico da EMC. Neste estudo utilizou-se de técnica parasitológica, sorológica e molecular (Figura 1). O Dot-Elisa é considerado uma técnica tão sensível e específica quanto a IFI, sendo, porém realizado de maneira mais rápida, de baixo custo e fácil de ser empregada na rotina clínica para o diagnóstico da ehrlichiose canina, além de não requerer equipamento sofisticado (Cadman et al., 1994; Harrus et al.,

2002) e neste estudo detectou anticorpos em 27 (44,3%) animais, enquanto na análise citológica do esfregaço sanguíneo em apenas um (1,6%) filhote foi visualizada mórula de *Ehrlichia* sp. A análise do esfregaço sanguíneo é um método diagnóstico simples e barato, fornecendo registro permanente (Rikihisa, 1991), no entanto as mórulas só são encontradas em 4% dos casos positivos (Harrus et al., 1997), provendo diagnóstico definitivo, embora seja um processo demorado e com muitos resultados falso-negativos aspecto observado nesta pesquisa e comprovado pela PCR. De acordo com Beall et al. (2008) a PCR pode ser mais sensível e específica que a identificação da mórula em monócitos, como demonstrado em sua pesquisa onde encontrou uma positividade na PCR em amostras clínicas onde inclusões não foram observadas.

Como existem reações cruzadas em exames sorológicos, particularmente entre membros do mesmo gênero (Cohn, 2003) e também devido a potencial similaridade dos sinais clínicos causado por vários patógenos transmitidos por carrapatos (Aguirre et al., 2006), a identificação da espécie pode não ser estabelecida na maioria dos estudos clínicos que utilizem apenas a sorologia. Portanto, a aplicação de técnicas moleculares é importante, pois permite determinar a espécie presente e co-infecções (babesiose, hepatozoonose ou infecções oportunistas) transmitidas pelos carrapatos (Inokuma et al., 2003; Paddock e Childs, 2003; Loftis et al., 2006). Dentre estas técnicas, a PCR (gene *dsb*) e a *nPCR* (16S rRNA), realizadas por Labruna et al. (2007) e Nakaghi et al. (2008), demonstrou ser as duas adequadas ao diagnóstico da EMC; no entanto, a *nPCR* é a única capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia* spp. Sendo tal aspecto evidenciado neste estudo, onde se

demonstrou infecção por *E. canis* no grupo de cães pesquisados.

Anaplasma platys tem sido agente estudado por diversos autores com agente único (Huang et al., 2005) ou na co-infecção com *E. canis* ou outros hemoparasitos na infecção canina (Santos et al., 2009). A porcentagem de cães infectados por este agente no presente estudo reforça a importância do mesmo na população canina tanto isoladamente ou em associação com outros agentes no município. A co-infecção de *E. canis* e *A. platys* tem sido relatado na literatura com frequência de 29% (Huang et al., 2005), concordando com o encontrado pelos autores (30,5%).

Com os dados obtidos pela técnica da *nPCR* conseguiu-se detectar infecção por *E. canis* e *A. platys* em filhotes e suas respectivas mães na cidade de Cuiabá, entretanto em PCR geral, etapa anterior a *nested PCR*, utilizando *primer* para *Ehrlichia* sp., obteve-se detecção de DNA em seis animais. A presença deste DNA ehrlichial não específico para tais agentes, reforça a importância de estudos mais aprofundados sobre estes agentes visando conhecer as demais espécies que parasitam cães da região, esta endêmica para ehrlichiose monocítica canina (Sousa, 2006).

CONCLUSÃO

A detecção de DNA de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em filhotes e suas mães levantam a possibilidade de transmissão transplacentária, entretanto estudos mais aprofundados devem ser realizados para se confirmar tal aspecto, principalmente em áreas endêmicas para a doença.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; RUIZ, L. et al. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, p.197-200, 2006.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S. et al. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321-325, 2009.
- BEALL, M.J.; CHANDRASHEKAR, R.; EBERTS, D.M. et al. serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, n.4, p.455-464, 2008.
- CADMAN, H.F.; KELLY, J.P.; MATTHEWMAN, R.Z. et al. Comparison of dot-blot enzyme immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v.135, n.15, p.362, 1994.
- COCCO, R.; SANNA, G.; CILLARA, M.; et al. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p.126-130, 2003.
- COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.33, p.863-884, 2003.
- 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. Jaboticabal, 118f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Patologia Animal). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal Small Animal Practice**, v.33, p.540-543, 1991.
- HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Records**, v.141, n.14, p.360-363, 1997.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal Clinical Microbiology**, v.37, p.2745-2749, 1999.
- HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H. et al. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.361-368, 2002.
- HARVEY, J.W., SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. **Journal Infectious Disease**, v.137, n.2, p.182-188, 1978.
- HERGARTY, B.C.; LEVY, M.G.; GAGER, R.F. et al. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.32-38, 1997.
- HESS, P.R.; ENGLISH, R.V.; HEGARTY, B.C. et al. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p.117-125, 2006.
- HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, v. 16, p. 13-21, 1991.
- HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J. et al. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.211-216, 2005.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K. et al. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.145-152, 2002.
- INOKUMA, H.; BEPPUA, T.; OKUDA, M. et al. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.343-348, 2003.
- JIMÉNEZ-COELLO, M.; PÉREZ-OSORIO, C.; VADO-SOLÍS, I. et al. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n.2, p.209-211, 2009.
- LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**, n.30, p.24-32, 2001.
- LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.189-195, 2007.
- LOFTIS, A.D.; REEVES, W.K.; SZUMLAS, D.E. et al. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. **Experimental & Applied Acarology**, n.40, p.67-81, 2006.

- MOTOI, Y.; SATOH, H.; INOKUMA, H. et al. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. **Microbiology and Immunology**, v.45, n.1, p.89-91, 2001.
- MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C. et al. Molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, n.4, p.325-339, 1998.
- NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.
- PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.1, p.37-64, 2003.
- RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 4, p.286-308, 1991.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ALBORNOZ, R.E.F.; BOLIO, G.M.E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.75-79, 2005.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v.179, p.145-148, 2009.
- SOUSA, V. R. F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***. 2006. Seropédica, 46f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SOUSA, V.R.F.; BOMFIM, T.C.B.; ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães diagnosticada pela PCR. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.3, p.281-283, 2009.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. Roca: São Paulo, 2002. 532p.
- TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.223-230, 2006.
- WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F. et al. 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**, v.95, p.1-15, 2001.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in the dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997.