



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FRANCISCA CEDMA DE SOUSA OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E ALTERAÇÕES CLÍNICO-
EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO EM CÃES ATENDIDOS NO
HOVET DA UFERSA**

MOSSORÓ

2020

FRANCISCA CEDMA DE SOUSA OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E ALTERAÇÕES CLÍNICO-
EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO EM CÃES ATENDIDOS NO
HOVET DA UFERSA**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga,
Profa. Dra.

MOSSORÓ

2020

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

048d Oliveira, Francisca Cedma de Sousa.
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE Ehrlichia canis E
ALTERAÇÕES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À
INFEÇÃO EM CÃES ATENDIDOS NO HOVET DA UFERSA /
Francisca Cedma de Sousa Oliveira. - 2020.
48 f. : il.

Orientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2020.

1. Doenças transmitidas por vetores. 2.
Erlíquiose canina. 3. PCR. 4. Rhipicephalus
sanguineus. 5. Semiárido. I. Fortes Vilarinho
Braga, Juliana, orient. II. Título.

FRANCISCA CEDMA DE SOUSA OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* E ALTERAÇÕES CLÍNICO-
EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO EM CÃES ATENDIDOS NO
HOVET DA UFERSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em MEDICINA VETERINÁRIA.

Defendida em: 07 / 02 / 2020.

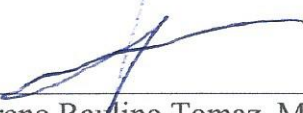
BANCA EXAMINADORA



Juliana Fortes Vilarinho Braga, Profa. Dra. (UFERSA)
Presidente



João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, M.V. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Klivio Loreno Raulino Tomaz, M.V. MSc. (UFERSA)
Membro Examinador

*Aos meus pais, Maria e Eider, por todo amor,
incentivo, confiança e paciência.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, meu guia e protetor de todas as horas.

Agradeço aos meus pais, Maria e Eider, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem e sonharem ao meu lado. Agradeço por todo o carinho e confiança que depositaram em mim. Essa conquista é nossa, amo vocês.

Agradeço aos meus irmãos Rebeka e Renato por toda palavra de incentivo, por estarem presentes nos momentos de superação, mas também, nos momentos de irritabilidade e estresse. Vocês são muito importantes para mim.

Aos meus sobrinhos Letícia, Gabriel, Maria Eduarda e João Miguel, pelo carinho, transmitindo para mim toda serenidade e inocência que tanto precisei nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Professora Juliana pela orientação, por todo aprendizado, dedicação, paciência, confiança, conselhos e convívio. Grata pela sua participação ativa na minha formação profissional.

Ao membros da banca examinadora, M.V. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes e M.V. MSc. Klivio Loreno Raulino Tomaz, por terem aceitado o convite para participar da minha banca de defesa de monografia. O conhecimento científico, experiência profissional, sugestões e discussões sobre o trabalho contribuirão muito para o enriquecimento do mesmo, e também para o meu conhecimento profissional.

Ao meu grande amigo Bruno, por todo carinho durante o tempo de curso, por se mostrar disposto a ajudar sempre que precisei, pelas risadas, horas de estudos, pelo companheirismo. Você foi essencial nesta fase final do curso, pois, sem tua ajuda, empenho, dedicação, eu não teria conseguido. Sou eternamente grata a sua pessoa, você é especial, maninho.

À minha querida amiga Íris, pelo carinho durante nosso convívio na universidade, por se fazer presente, por me incentivar e orientar a ser um profissional e pessoa melhor. Obrigada pela sua amizade, companheirismo e todos os momentos vividos.

À Raylanne e Sandy, pela amizade conquistada, por toda ajuda no laboratório, nas coletas, nas discussões científicas, vocês foram essenciais nessa jornada final.

Às residentes do HOVET-UFERSA, Luanda, Diane, Stphanie e em especial, à Emanuelle e Giovana, por todo convívio, conhecimentos repassados, paciência, amizade durante os estágios. Meu muito obrigada, por tudo.

Aos amigos queridos e familiares, vocês são muito mais importantes do que pensam. Obrigado por estarem sempre por perto, pelo interesse, pelas palavras de incentivo, por todo carinho, por tornarem toda essa luta mais suportável e por me fazerem mais feliz.

A Grande Conquista é o resultado de pequenas
vitórias que passam despercebidas.

Paulo Coelho

RESUMO

A erliquiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada pela bactéria *Ehrlichia canis* e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. A ampla distribuição do vetor, alta frequência da doença e inespecificidade dos sinais clínicos tornam frequente a suspeita da doença na clínica médica de cães. Diante disso, objetivou-se determinar a ocorrência e as características clínico-epidemiológicas associadas à infecção por *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Foram analisados 30 cães, independente de sexo, raça, idade e suspeita clínica. Após anamnese e exame clínico, foram coletadas amostras sanguíneas para extração de DNA e realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), além de carrapatos para identificação taxonômica. Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à PCR para detecção do gene de beta-actina e *nested* PCR para detecção do gene 16S rRNA de *E. canis*. Na população canina analisada, em 13,3% (4/30) houve detecção do DNA de *E. canis*. Em 75% (3/4) desses animais, houve suspeita clínica da doença. Dentre todos os parâmetros analisados, apenas com relação à idade foi observada associação ($p < 0,05$) à infecção por *E. canis*, sendo a detecção da bactéria mais frequente em cães com menos de dois anos de idade. Todos os cães estudados apresentavam histórico (100%, 30/30) e/ou presença de carrapato (30%, 9/30), sendo todos identificados como *R. sanguineus*. Dessa forma, a PCR permitiu a identificação de *E. canis* e pode auxiliar no diagnóstico diferencial em cães com sinais clínicos inespecíficos e histórico de parasitismo por carrapatos.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por vetores. Erliquiose canina. PCR. *Rhipicephalus sanguineus*. Semiárido.

ABSTRACT

Canine ehrlichiosis is a worldwide disease caused by the bacterium *Ehrlichia canis* and transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. The wide distribution of the vector, the high frequency of the disease and the non-specificity of clinical signs make the disease common in the clinical practice of dogs. Therefore, the aim of this study was to determine the occurrence and the clinical and epidemiological characteristics associated with infection by *E. canis* in dogs treated at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Thirty dogs were analyzed, regardless of gender breed or age, under any clinical suspicion. After anamnesis and clinical examination, blood samples were collected for DNA extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR), in addition to ectoparasites (ticks) for taxonomic identification. After DNA extraction, the samples were subjected to PCR to detect the beta-actin gene and, then, nested PCR to detect the *E. canis* 16S rRNA gene. *E. canis* DNA was detected in 13.3% (4/30) of the canine population analyzed. In 75% (3/4) of these animals, there was clinical suspicion of the disease. Among the parameters analyzed, only age was associated ($p < 0.05$) to infection by *E. canis*, with the bacterial detection being more frequent in dogs under two years old. All dogs studied had a history (100%, 30/30) and/or presence of ticks (30%, 9/30), which were identified as *R. sanguineus*. Thus, PCR allowed the identification of *E. canis* and may aid in the differential diagnosis in dogs with nonspecific clinical signs and with a history of tick parasitism.

Keywords: Tick-borne diseases. Canine ehrlichiosis. PCR. *Rhipicephalus sanguineus*. Semiarid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Detecção de gene 16S rRNA de *E. canis* por *nested* PCR em cães atendidos no HOVET/UFERSA, Mossoró/RN, 2020. Gel de agarose a 2%. L: Marcador de peso molecular, 100 pb; C+: controle positivo, DNA de *E. canis*; C-: controle negativo; 11, 21, 24 e 27: amplificação do gene 16S rRNA de *E. canis* com aproximadamente 389 pb.....30
- Figura 2. Identificação taxonômica de carrapatos obtidos em cão infectado por *Ehrlichia canis*, HOVET/UFERSA, Mossoró/RN, 2020. Em A) *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: fêmea com escudo curto e macho com 01 par de placas adanais; e em B) *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: macho com vista dorsal e escudo completo.31
- Figura 3. Frequência de sinais clínicos em cães de população hospitalar naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, Mossoró/RN, 2020.....32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genes alvos, sequências de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) e tamanho dos produtos amplificados em PCR para beta-actina de cão (controle endógeno) e <i>Ehrlichia canis</i> em amostras sanguíneas de cães em Mossoró/RN, 2020.....	28
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos associados à infecção por <i>Ehrlichia canis</i> em cães atendidos no HOVET/UFERSA, Mossoró/RN, 2020.	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Actb	Beta-actina
ALT	Alanina aminotransferase
BID	<i>Bis in die</i> (duas vezes ao dia, a cada 12 horas)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DEPC	Dietilpirocarbonato
DH82	Dog histiocytosis 82
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTV's	Doenças transmitidas por vetores
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-linked immunossorbent assay
FA	Fosfatase alcalina
HOVET	Hospital Veterinário
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Kilograma
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
qPCR	PCR em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RN	Rio Grande do Norte
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SID	<i>Semel in die</i> (uma vez ao dia, a cada 24 horas)
sp.	Espécie
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TPC	Tempo de preenchimento capilar
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Aspectos históricos.....	15
2.2 Etiologia.....	15
2.3 Ciclo de transmissão	16
2.4 Aspectos epidemiológicos	17
2.5 Patogenia e sinais clínicos	18
2.6 Exames laboratoriais.....	20
2.6.1 Exames hematológicos.....	21
2.6.2 Exame citológico.....	21
2.6.3 Exames bioquímicos	21
2.6.4 Testes sorológicos	22
2.6.5 Testes moleculares	22
2.7 Tratamento.....	23
2.8 Profilaxia e controle.....	23
2.9 Saúde pública	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Cães e amostras biológicas.....	27
4.2 Extração de DNA e amplificação do DNA de <i>Ehrlichia canis</i>	27
4.2.1 Extração do DNA genômico das amostras sanguíneas	27
4.2.2 Amplificação do gene 16S rRNA de <i>Ehrlichia canis</i>	27
4.2.3 Eletroforese em gel de agarose a 2%	29
4.3 Identificação taxonômica dos carrapatos	29
4.4 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	33
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA.....	47

1 INTRODUÇÃO

Cães e humanos estão expostos e são susceptíveis a infecção por muitos patógenos causadores de doenças transmitidas por vetores (DTV's), como a erliquiose, que já foi diagnosticada em cães e humanos associadas aos agentes *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* (NICHOLSON *et al.*, 2010). Nesse contexto, os cães têm papel de destaque, uma vez que são frequentemente infectados por patógenos transmitidos por vetores e possuem papel crucial como reservatórios e hospedeiros no ciclo de vida desses agentes (DAY, 2011; MAIA *et al.*, 2015).

A erliquiose canina é uma doença de distribuição cosmopolita transmitida por carrapatos causada por uma alfa-proteobactéria intracelular obrigatória, *Ehrlichia canis* (*E. canis*), (HARRUS & WANER, 2011), que infecta células hematopoiéticas maduras e imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear (DUMLER *et al.*, 2001). Uma das principais razões para a frequente ocorrência de *E. canis* é o seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, comum em áreas rurais e urbanas de regiões tropicais e subtropicais do mundo (AGUIAR *et al.*, 2007a; DANTAS-TORRES, 2008; AKTAS, 2014; AKTAS *et al.*, 2015). A infecção no hospedeiro vertebrado é possível em qualquer estágio de parasitemia do carrapato (ninfas e adultos) (ALMOSNY, 2002).

Atualmente, a distribuição da erliquiose no Brasil é ampla (VIEIRA *et al.*, 2011). Na última década, a doença tem sido identificada como causa de morbidade e mortalidade nos animais e no homem, representando uma importante zoonose, em decorrência da maior exposição humana a locais onde há presença de carrapatos e em regiões onde a erliquiose canina é enzoótica (MORAES *et al.*, 2004; SAITO, 2009). No Brasil, uma maior prevalência da doença tem sido observada na região nordeste (43%), contrastando com uma menor ocorrência da doença na região sul do país (1,7%) (BRITO, 2006).

O sucesso do tratamento da erliquiose canina depende da precocidade do diagnóstico, o que leva a uma melhora do prognóstico. Nesse sentido, os testes confirmatórios são de grande importância para se chegar a um diagnóstico definitivo da mesma. O diagnóstico da doença em cães frequentemente é desafiador para o clínico veterinário de pequenos animais devido a característica multissistêmica da doença (HARRUS & WANER, 2011), sendo este baseado na combinação dos sinais clínicos, alterações hematológicas e achados citológicos, além de testes sorológicos. Dentre esses, a reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste sorológico mais amplamente utilizado para o diagnóstico de erliquiose canina (WANER *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo incorporada ao plano diagnóstico (NEER & HARRUS, 2006). Contudo, a amplificação do DNA por meio de PCR forneceu um diagnóstico direto mais sensível, específico e confiável (IQBAL *et al.*, 1994). Sendo assim, as técnicas moleculares surgem como metodologia alternativa para o diagnóstico, identificação e diferenciação de microrganismos, sobrepondo às limitações das técnicas convencionais de diagnóstico.

Estudos realizados em região semiárida do nordeste brasileiro, utilizando testes sorológicos, constataram alta prevalência de anticorpos anti-*E. canis*, esses dados são consistentes com infecções prolongada e estimulação antigênica crônica (ROTONDANO *et al.*, 2015; AZEVEDO *et al.*, 2011; ARAES-SANTOS *et al.*, 2015; TANIKAWA *et al.*, 2013). Outros trabalhos usando testes moleculares, demonstraram alta prevalência de *E. canis*, sendo este o principal patógeno transmitido por carrapatos de cães domésticos ((ROTONDANO *et al.*, 2015; HARRUS & WANER, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2019).

Portanto, a erliquiose canina deve ser incluída como parte do diagnóstico diferencial nos cuidados veterinários de rotina, visto que o vetor, o carrapato *R. sanguineus* sensu lato é endêmico, e responsável por transmitir outros agentes além de *E. canis*, causando sintomatologia semelhante, dificultando o diagnóstico definitivo (ROTONDANO *et al.*, 2015). Diante dessa problemática, e da escassez de estudos sobre a doença na região semiárida potiguar, torna-se evidente a necessidade de estudos que determinem a ocorrência da erliquiose em cães na região, assim como as alterações clinicopatológicas visando melhorias no diagnóstico e adoção de medidas específicas no tratamento, controle e profilaxia da mesma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos

A erliquiose canina foi descrita inicialmente por Donatien & Lestoquard em um cão da raça Pastor Alemão no Instituto Pasteur na Argélia, em 1935, quando foram observados pequenos organismos semelhantes a *Rickettsia* (nomeados *Rickettsia canis*) no interior de monócitos em esfregaço sanguíneo de cães infestados por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. No ano de 1945, Moshkovshi renomeou *Rickettsia canis* para *Ehrlichia canis*, em homenagem ao famoso bacteriologista alemão, Paul Ehrlich (McDADE, 1990).

A doença já foi conhecida por pancitopenia tropical canina, riquetsiose canina, febre hemorrágica canina, doença do cão farejador, tifo canino e doença de Nairóbi (HARRUS *et al.*, 1997). A erliquiose canina ganhou importância mundial durante a Guerra do Vietnã, devido as perdas de um grande número de cães militares dos Estados Unidos (HUXSOLL *et al.*, 1970). Desde então, a erliquiose canina tem sido reconhecida mundialmente e é considerada uma das doenças mais importantes que acometem os cães, podendo causar infecções graves e fatais (NAKAGHI *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2010). No Brasil, a erliquiose canina foi relatada pela primeira vez em Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA *et al.*, 1973).

2.2 Etiologia

A erliquiose canina é uma doença causada por bactérias do gênero *Ehrlichia* pertencentes à família *Anaplasmataceae*, que possui importantes patógenos em medicina veterinária e saúde pública. O gênero *Ehrlichia* contempla as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER *et al.*, 2001; SHIBATA *et al.*, 2000), sendo essa classificação oriunda de informações de biologia molecular referentes aos genes 16S rRNA e *groESL*. Uma possível sexta espécie designada como *Ixodes ovatus Ehrlichia* (*Ehrlichia* IOE) detectada em carrapatos *Ixodes ovatus* no Japão, causou infecção subclínica em cães durante estudo de infecção experimental (WATANABE *et al.*, 2006).

Três espécies foram descritas até o momento no Brasil: *E. canis* (COSTA *et al.* 1973; LABRUNA *et al.*, 2007; UENO *et al.*, 2009) e *E. ewingii* acometendo cães (OLIVEIRA *et al.*, 2009) e *E. chaffeensis* acometendo um veado pantaneiro (MACHADO *et al.*, 2006). Até o momento, não foram identificados no Brasil o DNA de *E. muris* e *E. ruminantium*, que acometem roedores e ruminantes, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 2011). *E. canis* é a principal

espécie que acomete cães no Brasil. No entanto, há descrição de um relato que comprova a infecção por *E. ewingii* em cinco cães em Viçosa, Minas Gerais (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As bactérias do gênero *Ehrlichia* são microrganismos intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas de mamíferos, como monócitos, linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, e nos carrapatos encontram-se em células do epitélio intestinal e glândulas salivares (STICH *et al.*, 2008; DUMLER *et al.*, 2001).

É classificada como α -proteobactéria, morfológicamente caracterizada como pleomórfica, cocobacilos, Gram-negativa, com parede celular não proteica, ausente de lipopolissacarídeo e peptidoglicano e com capacidade de incorporação de colesterol à membrana, o que pode facilitar o processo de adaptação às células do vetor e do hospedeiro vertebrado (RIKIHISA, 2006). Possui um envelope formado por uma fina membrana externa rugosa e possui apenas um cromossomo, circular, contendo 1.315.030 nucleotídeos (MAVROMATIS *et al.*, 2006).

E. canis possui 0,2-0,4 μ m de diâmetro e se replica por fissão binária no interior dos leucócitos (monócitos) circulantes do hospedeiro vertebrado, formando inclusões intracitoplasmáticas, denominadas mórulas. Os microrganismos deixam os leucócitos por exocitose ou por rompimento das mesmas, indo infectar novas células (SILVA, 2001). O agente pode ser cultivado em linhagem celular originária de monócitos caninos, conhecida por DH82 (*dog histiocytosis* 82).

2.3 Ciclo de transmissão

Os hospedeiros vertebrados mais importantes e comuns da erliquiose canina são os membros da família *Canidae* (cães, coiotes, raposa e chacal) (PEREZ *et al.*, 2006). A transmissão de *E. canis* ocorre durante o repasto sanguíneo do carrapato *R. sanguineus* sensu lato infectado, o qual mantém a bactéria por transmissão transestadial (BREMER *et al.*, 2005). O mesmo deve permanecer fixado por, pelo menos, oito horas no cão, para efetiva transmissão do agente, pois a temperatura do vetor deve aumentar para que haja reativação de *E. canis* (SANTARÉM & DE AGUIAR, 2018).

O carrapato *R. sanguineus* sensu lato, que no Brasil é conhecido como carrapato vermelho do cão, apresenta distribuição mundial devido a sua capacidade de adaptação a diferentes climas. No Brasil, as frequências de carrapatos *R. sanguineus* sensu lato encontrados naturalmente infectados por *E. canis* têm variado de 2,3 a 6,2% (AGUIAR *et al.*, 2007a). Essa

espécie de ectoparasita tem preferência por cães, mas pode se alimentar em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos (DANTAS-TORRES, 2010).

O carrapato é infectado por *E. canis* ao ingerir leucócitos circulantes infectados, podendo permanecer infectado por aproximadamente um ano (MAVROMATIS *et al.*, 2006). Após a transmissão, a bactéria invade os tecidos do vetor, multiplicando-se em células epiteliais do intestino, hemócitos e células das glândulas salivares. No carrapato, não há transmissão transovariana e, por isso, as larvas de *R. sanguineus* sensu lato não transmitem a infecção aos cães (STICH *et al.*, 2008). Os machos de *R. sanguineus* sensu lato podem parasitar os cães várias vezes e, deste modo, podem infectar ou transmitir *E. canis* na ausência de carrapatos fêmeas (BREMER *et al.*, 2005). Diante da ausência de transmissão transovariana nos carrapatos e do prolongado estado de portador de *E. canis*, o cão é considerado o principal reservatório da doença (AGUIAR *et al.*, 2007a).

Segundo Santarém & De Aguiar (2018), a transmissão iatrogênica também deve ser considerada na epidemiologia da doença. Depois dos carrapatos, os meios de transmissão do patógeno mais relevantes entre os cães são agulhas contaminadas e cirurgias. Ainda, *E. canis* pode ser transmitida por meio de transfusões sanguíneas de um cão infectado para outro suscetível (BORIN *et al.*, 2009).

2.4 Aspectos epidemiológicos

A distribuição geográfica de artrópodes e agentes transmitidos por vetores está se expandindo devido a mudanças climáticas, ecológicas e ambientais (GRAY *et al.*, 2009). Nesse contexto, agentes como *E. canis*, surgiram como patógenos importantes entre os animais domésticos em todo o mundo (ANDRÉ *et al.*, 2015). *E. canis* ocorre em muitos países de clima temperado, tropical e subtropical do mundo, coincidindo com a prevalência do seu vetor (ALMOSNY, 2002).

A bactéria tem sido relatada em cães em várias regiões do Brasil (DAGNONE *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2016), assim como seu vetor *R. sanguineus* sensu lato, que se encontra distribuído por quase todo território urbano do país. As condições climáticas brasileiras são ideais para manutenção do vetor e a grande população canina errante no Brasil contribuiu para a disseminação desse carrapato (LABRUNA *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado prevalência de erliquiose variando entre um e 70% em populações caninas de ambientes urbanos, rurais ou atendidas em clínicas e hospitais veterinários em diversas regiões do Brasil, seja por testes sorológicos ou moleculares (VIEIRA

et al., 2011; DAGNONE *et al.*, 2003; LABARTHE *et al.*, 2003; BULLA *et al.*, 2004; TRAPP *et al.*, 2006). Alguns desses estudos demonstraram prevalência variando de 4,8% no extremo sul do Brasil a 70,9% na região Centro-Oeste (MELO *et al.*, 2011, SAITO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2009; UENO *et al.*, 2009; COSTA Jr. *et al.*, 2007). Essa menor prevalência na região sul do país decorre do tipo de táxon *R. sanguineus* sensu lato existente nessa região, que são de uma cepa que possui menor competência para transmitir *E. canis* (MONGRUEL *et al.*, 2018), sendo a linhagem tropical a que se mostrou um vetor competente de *E. canis* (MORAES-FILHO *et al.*, 2015).

Devido a sua natureza crônica e ao clima do nosso país, a doença é prevalente o ano inteiro, enquanto no hemisfério norte é mais comum durante o verão (BERRADA & TELFORD, 2009).

Aparentemente, não há predisposição por faixa etária (HARRUS *et al.*, 1997), tendo sido relatada em cães com dois meses a 13 anos de idade (SOUZA *et al.*, 2010), no entanto, o agente é detectado mais comumente em animais de até um ano de idade, sugerindo que os jovens são mais acometidos pela fase aguda da doença (COHN, 2003; MORETTI *et al.*, 2006). A infecção por *E. canis* não demonstra predisposição por sexo e, quanto ao padrão racial, alguns estudos demonstram maior susceptibilidade de Pastor Alemão (HARRUS *et al.*, 1997; TILLEY *et al.*, 2003), além de Dobermans e Pinchers (TILLEY *et al.*, 2003).

A doença apresenta alta morbidade e a letalidade varia conforme a fase da doença (SANTARÉM & DE AGUIAR, 2018). A severidade depende da suscetibilidade racial, idade do animal, alimentação, doenças concomitantes e patogenicidade da cepa infectante (SILVA, 2001; DA SILVA *et al.*, 2010). É importante destacar que o vetor da erliquiose canina, *R. sanguineus* sensu lato, é capaz de transmitir outras importantes hemoparasitoses para cães, fato este que torna relativamente comum a coinfeção de *E. canis* com outros hemoparasitos, como *Anaplasma* sp. (MOREIRA *et al.*, 2003; DAGNONE *et al.*, 2009), *Babesia* sp. (TRAPP *et al.*, 2006; BORIN *et al.*, 2009), *Hepatozoon* sp. (MUNDIM *et al.*, 2008) e *Mycoplasma* sp. (MOREIRA *et al.*, 2005). A ocorrência de coinfeção com esses ou outros patógenos, como *Leishmania* sp., pode acelerar ou agravar o curso da doença (COHN, 2003; MORETTI *et al.*, 2006).

2.5 Patogenia e sinais clínicos

A erliquiose canina caracteriza-se por ser uma doença multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia em intensidade de acordo com a fase clínica da doença

(KAKOMA *et al.*, 2000). A patogenia da doença envolve um período de incubação de oito a 20 dias e, então, seguem-se as fases aguda, subclínica (assintomática) e crônica (SANTARÉM & DE AGUIAR, 2018). Essas fases foram definidas com base nos sinais clínicos e alterações clinicopatológicas demonstradas em estudos por infecção experimental, no entanto a diferenciação precisa das fases da doença em infecção natural é difícil (GREENE, 2006).

Após a inoculação de *E. canis* no cão pela picada do carrapato durante o parasitismo (DE AGUIAR, 2015), a bactéria invade as células mononucleares no formato de corpúsculos elementares e, uma vez dentro da célula hospedeira, inibe a fusão fagolisossomal, agindo como mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro (SANTARÉM & DE AGUIAR, 2018). As bactérias multiplicam-se formando os corpúsculos iniciais (um a três dias pós-infecção) e as mórulas (sete a 12 dias subsequentes) (DE AGUIAR, 2015). Essas são estruturas com coloração idêntica àquelas dos corpúsculos iniciais e constituídas por um a três vacúolos de membrana simples, contendo de um a 40 corpúsculos, podendo variar de 2 a 4 µm de diâmetro (ALVES, 2010).

Na célula, a bactéria circula por todo o organismo, estabelecendo-se em maior quantidade em órgãos em que predominam células do tecido mononuclear fagocitário, como fígado, baço e linfonodos, causando linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular (COHN, 2003). Os monócitos infectados são transportados pelo sangue para outros órgãos do corpo, especialmente pulmões, rins e meninges, e aderem-se ao endotélio vascular, induzindo vasculite e infecção tecidual subendotelial (ALMOSNY, 2002; ETTINGER & FELDMAN, 2004).

As principais alterações clínicas observadas na fase aguda são febre intermitente, apatia e anorexia (CASTRO *et al.*, 2004; HASEGAWA, 2005; SOUZA *et al.*, 2010). As tendências hemorrágicas da fase aguda se restringem a petéquias em pele e mucosas, porém, dependendo da gravidade da infecção, os cães podem apresentar quadros gastroentéricos, com vômitos e diarreias acompanhadas ou não de sangue (COHN, 2003), as quais são geralmente causadas por uma combinação de trombocitopenia moderada e vasculite (BRANDÃO *et al.*, 2006; BULLA *et al.*, 2004).

Outros sinais clínicos relatados na fase aguda da doença são perda de peso, secreção oculonasal, esplenomegalia, mucosas hipocoradas (NAKAGHI *et al.*, 2008; BORIN *et al.*, 2009; HARRUS & WANER, 2011), uveíte anterior, coriorretinite e hemorragia da retina (HARRUS & WANER, 2011). Estes sinais geralmente regredem espontaneamente em uma a quatro semanas, porém os cães podem entrar em uma fase assintomática ou subclínica, podendo permanecer infectados com a *E. canis* por longos períodos (ORIÁ *et al.*, 2004; GREENE, 2006) e com altos títulos de anticorpos (VARELA, 2003; HARRUS *et al.*, 1998).

Geralmente, os sinais clínicos da fase subclínica são brandos e, na maioria das vezes, passam despercebidos pelos proprietários. Ela ocorre após seis a nove semanas de incubação e caracteriza-se pela persistência da trombocitopenia, leucopenia variável e anemia na ausência de sinais clínicos (BREITSCHWERDT, 1997). Ao final da fase subclínica, instala-se a fase crônica, com sinais clínicos severos. Nesta fase, dificilmente encontra-se inclusões de mórulas de *E. canis* nos leucócitos (MACHADO, 2004).

Na fase subclínica, os cães imunocompetentes podem eliminar o agente e cessar a doença, não entrando na fase crônica (VARELA, 2003; BREITSCHWERDT, 2004). No entanto, na maioria das vezes a bactéria persiste de forma intracelular (LAPPIN, 2001) e, então, esses cães clinicamente saudáveis permanecem potenciais portadores persistentes por anos (HARRUS *et al.*, 1998; ORÍÁ *et al.*, 2004; GREENE, 2006).

A fase crônica da doença pode ocorrer meses ou anos após a infecção, com os sinais da fase aguda reaparecendo de maneira atenuada ou grave, podendo levar o cão a óbito (DE AGUIAR, 2015). Essa fase caracteriza-se por supressão medular, sangramentos por mucosas e conjuntivas e alta letalidade, sendo comumente mais grave que as outras fases da doença. Pode ocorrer pancitopenia (DAGNONE *et al.*, 2001) devido a hipoplasia medular que leva à anemia aplásica, monocitopenia e linfopenia (GREGORY & FORRESTER, 1990).

Os sinais clínicos atribuídos a distúrbios hemorrágicos como epistaxe, melena, petéquias, equimoses, hifemas e hematúria ocorrem em até 60% dos casos (COHN, 2003). Outros sinais sistêmicos como febre, linfadenopatia, mucosas hipocoradas, esplenomegalia, oftalmopatias (uveíte bilateral e afecções de retina), pneumonia intersticial, insuficiência renal, artrite, polimiosite, edemas de extremidades e anormalidades neurológicas também são descritos. Sangramento prolongado durante o estro, infertilidade, abortos e mortes neonatais também já foram relatados na doença (SOUZA *et al.*, 2010; HARRUS & WANER, 2011; FREIRE *et al.*, 2017). Poliúria, polidipsia e proteinúria são relatados em alguns cães que desenvolvem insuficiência renal (LOCATELLI *et al.*, 2012). Cães nesta fase podem eventualmente morrer por infecções secundárias ou hemorragias graves, portanto, o diagnóstico da doença antes do desenvolvimento da fase crônica da erliquiose é essencial para o prognóstico (GREENE, 2006).

2.6 Exames laboratoriais

Como a erliquiose canina é compreendida por diferentes fases e múltiplas manifestações clínicas, o diagnóstico da doença se torna um desafio para o médico veterinário (SANTARÉM

& DE AGUIAR, 2018). A doença pode ser diagnosticada pela associação de achados clínicos e laboratoriais (MACHADO, 2004), testes sorológicos (ORIÁ, 2001; NAKAGHI *et al.*, 2008), testes de biologia molecular (ALVES *et al.*, 2005; NAKAGHI *et al.*, 2008), exames bioquímicos, cultivo celular, alterações macroscópicas à necropsia e histopatologia (DAGNONE *et al.*, 2003; ALMOSNY, 2002; BABO-TERRA, 2004).

2.6.1 Exames hematológicos

As anormalidades hematológicas típicas na fase aguda incluem trombocitopenia, leucopenia e leve anemia normocítica normocrômica regenerativa, devido à perda de sangue (NELSON & COUTO, 2006). Na fase subclínica há persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos (BREITSCHWERDT, 2004). Na fase crônica, destaca-se a anemia arregenerativa e neutrofilia com desvio à esquerda, trombocitopenia e eosinopenia (BORIN *et al.*, 2009). Além da trombocitopenia, as plaquetas circulantes ficam inativas, principalmente pela diminuição da agregação plaquetária (BRANDÃO *et al.*, 2006). Os valores de hemoglobina sérica diminuem em virtude da resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro na tentativa de indisponibilizar ferro para *E. canis*, por meio da ligação deste com a proteína ferritina (BARNEWALL & RIKIHISA, 1994). Na fase crônica, há pancitopenia exacerbada e a anemia é geralmente a última alteração a ser observada na progressão da doença (MYLONAKIS *et al.*, 2010).

2.6.2 Exame citológico

O esfregaço sanguíneo é um método de diagnóstico rotineiramente utilizado para pesquisa de hemoparasitas devido a sua rápida execução e baixo custo (ALVES *et al.*, 2005). Apesar de suas vantagens, esta técnica nem sempre é eficaz para a detecção de mórulas, devido a constata flutuação da parasitemia durante o curso da doença, principalmente nas fases crônicas (ALMOSNY, 2002; BABO-TERRA, 2004; GREENE, 2006). A pesquisa de mórulas pode ser realizada também em tecidos como linfonodos e medula óssea, sendo a visualização mais comum na fase aguda da doença (HARRUS & WANER, 2011), portanto, o exame parasitológico direto do esfregaço sanguíneo é específico, porém pouco sensível (GREENE, 2006).

2.6.3 Exames bioquímicos

Durante qualquer fase da doença, pode-se observar graus variáveis de hipoalbuminemia e hiperproteinemia, principalmente pelo aumento das globulinas (α_2 , β_1 e β_2).

Consequentemente, há diminuição da relação albumina/globulina (NEER & HARRUS, 2006). Elevados níveis de fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase, ureia e creatinina são achados bioquímicos comuns nos casos em que há danos teciduais hepáticos e renais devido às alterações circulatórias e/ou imunomediadas desencadeadas pela erliquiose canina (MYLONAKIS *et al.*, 2010).

2.6.4 Testes sorológicos

Vários métodos sorológicos foram desenvolvidos para o diagnóstico da erliquiose canina e são considerados importantes para triagem da doença (HARRUS *et al.*, 1997). A soropositividade começa entre sete a 21 dias após a infecção, chegando a níveis máximos após 80 dias (ALMOSNY & MASSARD, 2002) e podendo os anticorpos IgG anti-*Ehrlichia* persistir por vários meses após o tratamento e eliminação da bactéria (HARRUS & WANER, 2011).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é utilizada no diagnóstico da doença, sendo considerado teste padrão para a pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* (HARRUS *et al.*, 1997). A técnica Dot-ELISA usa antígenos totais de *Ehrlichia* aplicados sobre superfícies de nitrocelulose e é fundamentada na detecção de IgG séricas (ARAÚJO *et al.*, 2001; WANER *et al.*, 2001). É importante ressaltar que, em áreas endêmicas, cães podem apresentar altos títulos de IgG para *E. canis*, sem demonstrar a doença clinicamente, causando um aumento no número de falsos-positivos nessas regiões (BULLA *et al.*, 2004).

2.6.5 Testes moleculares

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular conduziu a melhoria no diagnóstico da erliquiose canina com a detecção do DNA do agente (AGUIAR *et al.*, 2007b). O diagnóstico molecular de *E. canis* pode ser realizado a partir de material genético extraído de sangue total, soro sanguíneo e aspirados de baço e medula óssea (HARRUS *et al.*, 2004; MYLONAKIS *et al.*, 2009). Atualmente, a PCR tem sido muito utilizada para diagnóstico nas fases aguda ou crônica da erliquiose canina, estudos epidemiológicos da doença (HASEGAWA, 2005; SUTO *et al.*, 2001; MYLONAKIS *et al.*, 2003), avaliação do tratamento de animais (WEN *et al.*, 1997; HARRUS *et al.*, 1998), entre outros.

Ensaios de PCR para *E. canis* tem como alvo mais comum o gene 16S rRNA (ALVES *et al.*, 2005; PINYOOWONG *et al.*, 2008), mas outros alvos, incluindo P28 (NAKAGHI *et al.*, 2010) e a proteína dsb (DOYLE *et al.*, 2005) têm sido utilizados para a detecção de *E. canis*.

No sentido de melhorar a sensibilidade e identificar espécies de *Ehrlichia*, algumas variações da técnica têm sido empregadas, como a PCR em duas etapas (*nested* PCR) e PCR

em tempo real (qPCR) (HARRUS & WANER, 2011). Para amplificação de DNA de *E. canis* por *nested* PCR, a utilização de dois pares de *primers* aumenta a sensibilidade da técnica e a possibilidade de seu uso prático (WARNER & DAWSON, 1996; WEN *et al.*, 1997).

2.7 Tratamento

O tratamento da erliquiose canina se baseia na administração de antibacterianos, principalmente da classe das tetraciclina (DE AGUIAR, 2015). Dentre essas, a doxiciclina é considerada a droga de eleição (NEER *et al.*, 2002). Outros protocolos terapêuticos incluem dipropionato de imidocarb, cloranfenicol, associado ou não a doxiciclina (SAINZ *et al.*, 2000).

Olicheski (2003) relata que a literatura cita várias dosagens e tempo de duração no tratamento da erliquiose com doxiciclina. Brandão (2010) descreve o tratamento com doxiciclina na dose de cinco mg/kg, duas vezes ao dia (BID), por 21 dias. Chaves *et al.* (2007) citam a dose de doxiciclina de 10 mg/kg, uma vez ao dia (SID), durante 28 dias como tratamento de eleição, enquanto Varela (2003) cita a mesma dose e tempo de tratamento, porém inclui a possibilidade de administração de 12 em 12 horas. Além do tratamento específico, é importante instituir terapia de suporte, principalmente na fase crônica da doença, o que inclui fluidoterapia, transfusão sanguínea e suplementos vitamínicos, dependendo da gravidade do caso. Em alguns casos, pode ser necessário administrar anti-inflamatórios ou imunossuppressores (ALMOSNY & MASSARD, 2002; OLICHESKI, 2003; SHERDING, 2008).

O prognóstico para a erliquiose canina é favorável quando instaurado um tratamento adequado, a menos que a medula óssea fique severamente hipoplásica, neste caso o prognóstico torna-se reservado. Cães com doença crônica grave associada a pancitopenia ou anemia aplásica podem demorar meses para conseguir recuperação hematológica completa e, em alguns casos, a pancitopenia grave pode ser fatal (COUTO, 2003; SHERDING, 2008).

2.8 Profilaxia e controle

O controle do vetor é a medida mais eficaz na profilaxia da infecção por *E. canis*. (HARRUS *et al.*, 1997). Por isso, é imprescindível que a terapia carrapaticida atue tanto no hospedeiro como no ambiente em que ele está inserido (LABRUNA & PEREIRA, 2011). Para tanto, produtos acaricidas ambientais e de uso tópico são eficazes desde que seja realizado o manejo correto (WOODY & HOSKINS, 1991).

O mercado dispõe de uma enorme variedade de produtos acaricidas capazes de combater os carrapatos. Os mais utilizados são o amitraz, fipronil, piretróides, isoxazolinás, imidacloprid e permetrina. Recomenda-se promover uma inspeção rotineira nos cães, investigando a presença de carrapatos e removendo-os imediatamente (MASSARD & FONSECA, 2004; SHERDING, 2008; ZARDO & PEREIRA, 2019).

Todos os animais que entrarem em canis ou propriedades devem ser colocados em quarentena, sendo realizado tratamento para carrapatos. Recomenda-se realizar exames periódicos nos cães e, caso confirmada a infecção, realizar o tratamento e isolar os cães positivos para minimizar a fonte de infecção (NELSON & COUTO, 2001; SHERDING, 2008).

A exposição a *E. canis* não confere imunidade protetora e vacinas para cães não estão disponíveis comercialmente (HARRUS *et al.*, 1997).

2.9 Saúde pública

As doenças transmitidas por artrópodes envolvem vários agentes infecciosos, hospedeiros e vetores, afetando a saúde humana e animal (HARRUS & BANETH, 2005). Segundo Labruna *et al.* (2007), *E. canis* também pode afetar humanos, geralmente sem gravidade, causando sintomas de uma gripe, como mialgia, dor de cabeça e distúrbios gastrointestinais. *R. sanguineus* sensu lato, principal vetor da *E. canis*, embora apresente ectoparasitismo preferencial por cães, pode se alimentar em outras espécies de mamíferos, incluindo humanos (DANTAS-TORRES, 2010), com relatos no Brasil (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; LOULY *et al.*, 2006).

Segundo Vieira *et al.* (2011), no Brasil, dentre os relatos de detecção molecular do agente em cães, foi demonstrado haver completa similaridade entre a sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA da *E. canis* responsável por infecções em seres humanos na Venezuela e de uma amostra de *E. canis* proveniente de cães oriundos do estado de São Paulo. Nesse sentido, tudo indica que o mesmo agente causador de infecção canina no estado de São Paulo vem infectando humanos na Venezuela (DE AGUIAR, 2015).

Outras espécies de *Ehrlichia* podem afetar humanos, como *E. chaffeensis*, agente etiológico da erliquiose monocítica humana, considerada doença emergente e transmitida principalmente pelo carrapato *Amblyomma americanum* (COHN, 2003). Em seres humanos, a doença é mais grave em pacientes imunocompetentes, e os sinais clínicos são similares aos da espécie canina (NEER & HARRUS, 2006). *E. ewingii* é o agente etiológico da erliquiose granulocítica humana, infecção caracterizada por parasitismo em neutrófilos, sendo transmitida

também pelo carrapato *A. americanum* na América do Norte, embora haja relatos da sua transmissão por *R. sanguineus* sensu lato, aumentando as possibilidades de sua ocorrência no Brasil (DE AGUIAR, 2015). Além dessas, *Ehrlichia muris-like* e *Panola Mountain Ehrlichia* também já foram identificadas em humanos (SANTARÉM & DE AGUIAR, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a ocorrência e as características clínico-epidemiológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis* no Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia (HOVET) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência de *E. canis* em cães atendidos no HOVET/UFERSA por meio da detecção do DNA do agente em amostras sanguíneas;
- Identificar o perfil epidemiológico e os sinais clínicos mais frequentes em cães infectados por *E. canis* atendidos no HOVET/UFERSA; e
- Implantar a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção do DNA de *E. canis* no Laboratório Multiusuário da UFERSA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cães e amostras biológicas

Para este estudo foram analisados 30 cães, independente de sexo, raça ou idade, sob qualquer suspeita clínica atendidos no Hospital Veterinário Jerônimo *Dix-Huit* Rosado Maia (HOVET) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), no período de 03 de dezembro de 2019 a 24 de dezembro de 2019, mediante protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA (Processo N° 23091.013652/2018-95). No exame clínico foram avaliadas mucosas oculares para identificação de anemia ou icterícia, temperatura corporal, tempo de preenchimento capilar (TPC), presença de ectoparasitas e registro de quaisquer outras alterações clínicas em ficha própria (Apêndice), na qual também foram registradas suspeita clínica, raça, sexo, idade, histórico de ectoparasitas, entre outros. Dos cães incluídos no estudo foram colhidas amostras sanguíneas (1 mL) por venopunção da veia jugular ou cefálica em tubo contendo anticoagulante EDTA para extração de DNA e realização da PCR. Dos animais com presença de carrapatos, exemplares desses ectoparasitas foram coletados e armazenados em microtubos contendo álcool 70% para posterior identificação taxonômica da espécie. A coleta das amostras biológicas foi realizada mediante a autorização dos tutores dos animais.

4.2 Extração de DNA e amplificação do DNA de *Ehrlichia canis*

4.2.1 Extração do DNA genômico das amostras sanguíneas

A extração de DNA foi realizada a partir de 200 µL de sangue total utilizando-se o kit comercial (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Após extraído, a qualidade e a concentração do DNA foram analisadas em espectrofotômetro (NanoDrop™ Lite, Thermo Scientific) e as amostras armazenadas a -20 °C até o uso para PCR.

4.2.2 Amplificação do gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis*

O DNA extraído das amostras sanguíneas foi inicialmente submetido à PCR para detecção do gene de beta-actina de cão para controle endógeno de extração de DNA, segundo Turchetti (2014). Em seguida, as amostras foram submetidas à *nested* PCR para detecção do

gene 16S rRNA de *E. canis*, segundo Bulla *et al.* (2004), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e programas de amplificação previamente descritos (Quadro 1).

Quadro 1 - Genes alvos, sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e tamanho dos produtos amplificados em PCR para beta-actina de cão (controle endógeno) e *Ehrlichia canis* em amostras sanguíneas de cães em Mossoró/RN, 2020.

Gene alvo	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto (pb)	Referência
Beta-actina	Actb-F	GGCATCCTGACCCTGAAGTA	98	Turchetti (2014)
	Actb-R	CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT		
<i>Ehrlichia</i> sp. 16S rRNA	EHO-F	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	478	Bulla <i>et al.</i> (2004)
	EHO-R	CGTATTACCGCGGCTGCTGGC		
<i>E. canis</i> 16S rRNA	ECA-F	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA	389	
	ECA-R	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT		

Fonte: Elaboração do autor, 2020.

A PCR para beta-actina de cão foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão 10X, 0,4 µL de Taq DNA Polimerase, 2,0 µL de dNTP's (10 mM) (GeNet Bio), 1,5 µL (10 mM) de cada *primer*, 16,1 µL de água DEPC e 1 µL de DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad), utilizando o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C, por 30 segundos; anelamento a 60 °C, por 30 segundos; e extensão a 72 °C, por 30 segundos; e extensão final a 72 °C, por cinco minutos. Os produtos amplificados à PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL).

Em seguida, foi realizada a *nested* PCR, sendo a primeira reação para *Ehrlichia* sp. e a segunda reação específica para *E. canis*. A reação inicial foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão 10X, 0,4 µL de Taq DNA Polymerase, 2,0 µL de dNTPs (10 mM) (GeNet Bio), 1,5 µL (10 mM) de cada *primer* (EHO-F e EHO-R), 16,1 µL de água DEPC e 1 µL de DNA. O programa de amplificação utilizado foi desnaturação inicial 94 °C, por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C, por 60 segundos, anelamento a 60 °C, por 60 segundos e extensão a 72 °C, por 60 segundos; e extensão final a 72 °C por quatro minutos.

Todas as amostras foram submetidas à segunda reação, utilizando-se 1 µL do produto amplificado na primeira reação. Para a segunda PCR, o volume final também foi de 25 µL, contendo as mesmas soluções e volumes da reação inicial, no entanto utilizando-se *primers* específicos para *E. canis* 16S rRNA (ECA-F e ECA-R). O programa de amplificação da segunda reação foi o mesmo utilizado na primeira inicial. Em todas as PCRs foram utilizados controle negativo (água DEPC) e controle positivo (DNA de amostra sabidamente positiva para *E. canis*).

4.2.3 Eletroforese em gel de agarose a 2%

A detecção do gene 16S rRNA de *E. canis* foi realizada por eletroforese das amostras em gel de agarose à 2%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, utilizando o brometo de etídeo (0,5 mg/mL) como corante evidenciador do DNA. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse®). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Proteinsimple®) e registrado utilizando-se o programa AlphaImager Mini system.

4.3 Identificação taxonômica dos carrapatos

A identificação taxonômica dos carrapatos foi feita por meio da análise das características morfológicas, utilizando chaves de classificação, microscópio e/ou estereomicroscópio (ARAGÃO & FONSECA, 1961; SLOSS *et al.*, 1999; BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006).

4.4 Análise estatística

Os dados de frequência de infecção por *E. canis* foram dispostos em tabelas de distribuição de frequência simples. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para analisar a associação entre animais infectados por *E. canis* e as variáveis epidemiológicas (gênero, ≤ 1 ano e ≤ 2 anos de idade, acesso à rua, histórico e presença de carrapatos) e clínicas avaliadas (apatia, anorexia/hiporexia, febre, mucosas hipocoradas, desidratação, perda de peso, icterícia, epistaxe, onicogribose, edema, poliúria, polidipsia, petéquias, claudicação, conjuntivite, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, alterações digestivas, nervosas, respiratórias, reprodutivas, oftalmológicas e dermatológicas). Probabilidade menor que 0,05 ($p < 0,05$) foi considerada estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS

Em 13,3% (4/30) das amostras submetidas à *nested* PCR houve detecção do gene 16S rRNA de *E. canis*, amplificando um fragmento de aproximadamente 389 pb (Figura 1). Adicionalmente, em todas as amostras de DNA houve detecção do gene da beta-actina de cão (controle endógeno), amplificando um fragmento de aproximadamente 98 pb, demonstrando a viabilidade do DNA.

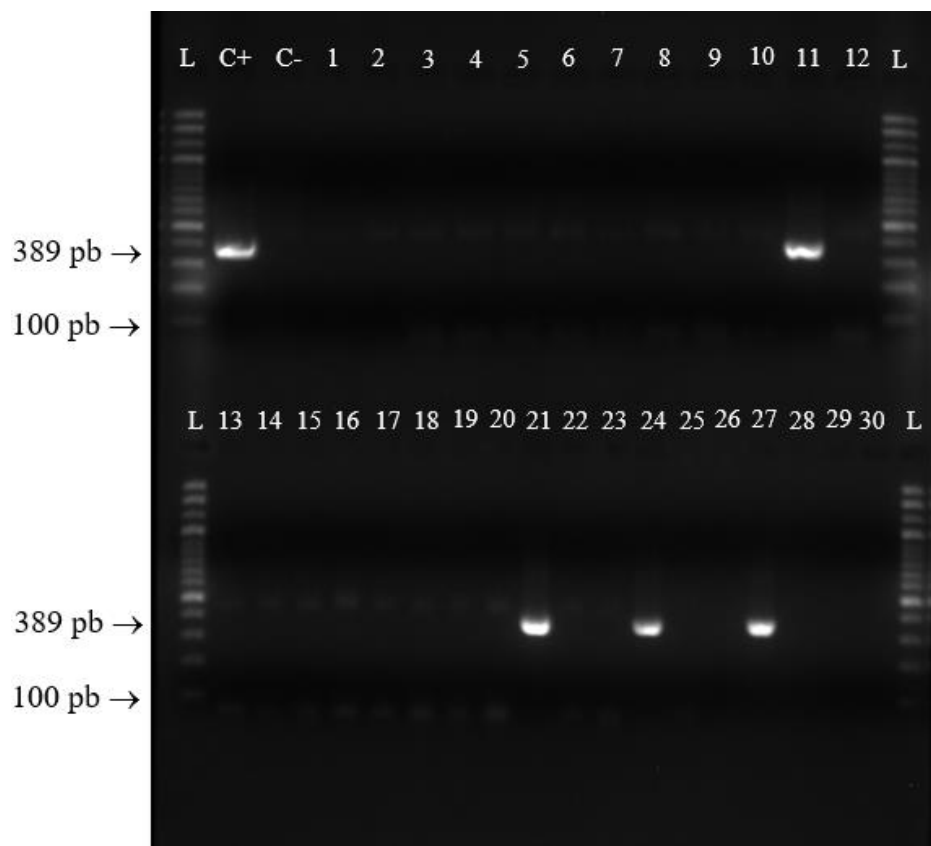


Figura 1. Detecção de gene 16S rRNA de *E. canis* por *nested* PCR em cães atendidos no HOVET/UFERSA, Mossoró/RN, 2020. Gel da agarose a 2%. L: Marcador de peso molecular, 100 pb; C+: controle positivo, DNA de *E. canis*; C-: controle negativo; 11, 21, 24 e 27: amplificação do gene 16S rRNA de *E. canis* com aproximadamente 389 pb.

Em três dos quatro animais positivos houve suspeita clínica (apresentavam sinais clínicos) de doenças transmitidas por vetores (erliquiose, anaplasmoses, babesiose, hepatozoonose e/ou leishmaniose), enquanto em um cão infectado não houve suspeita (sem sinais clínicos) da doença, uma vez que o mesmo foi levado para atendimento clínico devido a traumatismo automobilístico.

Os quatro animais positivos para *E. canis* eram fêmeas, mestiças e tinham idade igual ou inferior a dois anos, tendo sido este último o único fator de risco associado à positividade para *E. canis* ($p < 0,05$). Dentre os animais positivos, 50% (2/4) tinha acesso à rua (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados epidemiológicos associados à infecção por *Ehrlichia canis* em cães atendidos no HOVET/UFERSA, Mossoró/RN, 2020.

Variável		% (n/N)
<i>Sexo</i>	Fêmea	100,0 (4/4)
	Macho	0,0 (0/4)
<i>Faixa etária</i>	≤ 2 anos	100,0 (4/4)*
	> 2 anos	0,0 (0/4)
<i>Acesso à rua</i>	Sim	50,0 (2/4)
	Não	50,0 (2/4)
<i>Histórico de carrapatos</i>	Sim	100,0 (4/4)
	Não	0,0 (0/4)

*Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Todos os animais da população estudada possuíam histórico de ectoparasitismo por carrapatos, consequentemente, 100% (4/30) dos cães infectados naturalmente por *E. canis* haviam tido carrapato em algum momento da vida. Em apenas um dos animais positivos (25%, 1/4) foram observados carrapatos no momento do exame clínico.

É interessante destacar que ectoparasitismo por carrapatos foi observado em 30% (9/30) dos cães inseridos no estudo, sendo em todos os casos identificados como pertencentes à espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Figura 2).

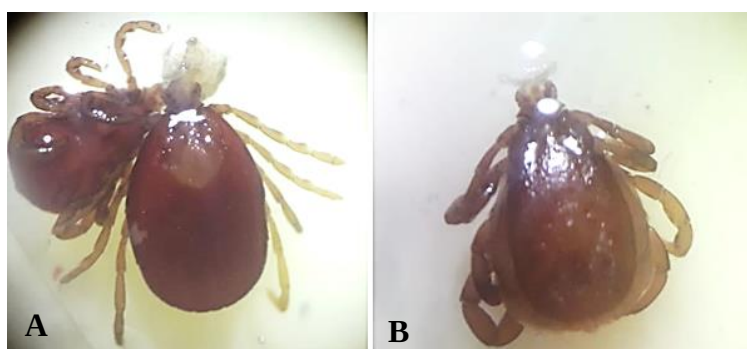
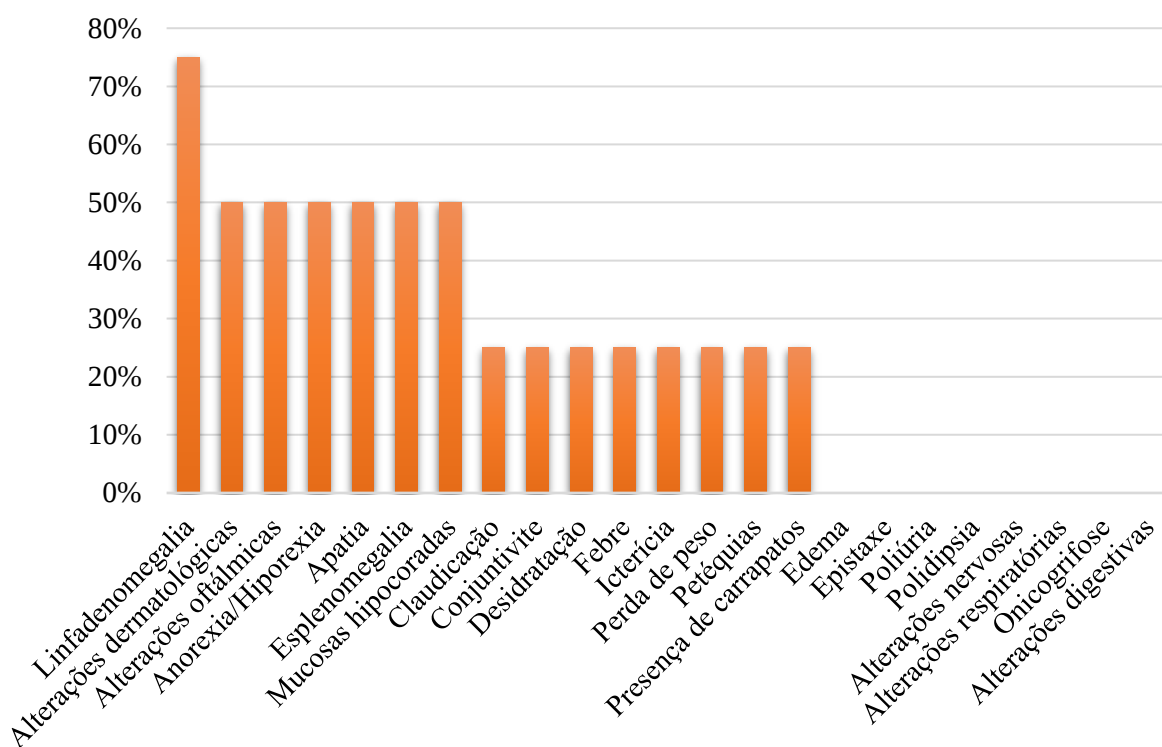


Figura 2. Identificação taxonômica de carrapatos obtidos em cão infectado por *Ehrlichia canis*, HOVET/UFERSA, Mossoró/RN, 2020. Em A) *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: fêmea com escudo curto e macho com 01 par de placas adanais; e em B) *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: macho com vista dorsal e escudo completo.

Linfadenomegalia, apatia, anorexia/hiporexia, esplenomegalia e mucosas hipocoradas foram alguns dos sinais clínicos mais frequentes nos animais infectados por *E. canis*, sendo observados em pelo menos metade dos cães (Figura 3). Vale ressaltar que nenhum desses sinais clínicos foi associado à positividade para *E. canis*, sendo comumente observados também em animais não infectados pelo agente.

Figura 3. Frequência de sinais clínicos em cães de população hospitalar naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, Mossoró/RN, 2020.



6 DISCUSSÃO

A erliquiose canina é reconhecida como uma das principais doenças infecciosas na clínica de pequenos animais, notadamente pela ampla disseminação do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato em todo Brasil (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Diante desse desafio, os médicos veterinários devem estar preparados para diagnosticar, tratar e prevenir esta e outras doenças transmitidas por vetores (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2016).

Neste estudo, 13,3% (4/30) dos animais testados foram positivos em ensaios de *nested* PCR para *E. canis* com base no gene 16S rRNA. Diferentemente desse resultado, Carlos *et al.* (2011) e Carvalho *et al.* (2008) obtiveram valores inferiores de 11% e 7,8%, respectivamente, esses pesquisadores encontraram esses percentuais em cães de população hospitalar e cães em visitas domiciliares aleatórias. Contudo, estudos realizados por Lopes *et al.* (2019) e Gonçalves *et al.* (2014) demonstraram resultados superiores de detecção de DNA de *E. canis* por PCR. Assim como Guedes *et al.* (2015), que detectou em 25,6% das amostras testadas o DNA de *E. canis* pelo teste de *nested* PCR. Esses resultados superiores pode estar relacionados a população de cães estudada por estes autores, onde utilizaram animais suspeitos de doenças transmitidas por carrapatos e amostras esplênicas, diferente do presente estudo, no qual foram analisados animais sob qualquer suspeita clínica, diminuindo assim, a chance de positividade para *E. canis*.

Em estudo realizado por Harrus *et al.* (2004) em que foram analisadas vários tipos de amostras, eles concluíram que em cães que se encontram em fase subclínica ou crônica, consequentemente com bacteremia variável, é interessante utilizar amostras esplênicas para realização da PCR para *E. canis*. Nesses caso, o animal pode não ser diagnosticado, e com isso a prevalência da doença ser inferior ao esperado. Contudo, a sensibilidade dos testes moleculares para espécies de *Anaplasmataceae* pode ser aumentada com o uso de testes de qPCR (HARRUS & WANER, 2011; SCHOTTHOEFER *et al.*, 2013). A *nested* PCR é a única capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia* sp. e a PCR é considerada a técnica mais sensível dentre as demais, sendo capaz de detectar o agente em pequenas concentrações e poucos dias pós-infecção.

Com relação às variáveis epidemiológicas, somente a idade dos animais (≤ 2 anos) foi associada à positividade para *E. canis* ($p < 0,02$). Aproximando-se do observado nesse estudo, Borin *et al.* (2009) encontraram maior número de animais com erliquiose em faixa etária de até três anos de idade. Em estudos realizados por Witter *et al.* (2013) e Ueno *et al.*, (2009) foram observados resultados diferentes, onde a frequência foi maior em animais com menos de 12 meses de idade.

Todos os animais positivos para *E. canis* eram fêmeas, as quais também representaram a maioria da população amostrada (70%, 21/30), situação semelhante à descrita por Borin *et al.* (2009). Esse resultado pode ser justificado pelo caráter transversal do estudo, pelo reduzido número de cães em relação a outros trabalhos e ao maior número de cães do sexo feminino na população avaliada, aumentando assim as chances de prevalência da infecção entre indivíduos fêmeas, constituindo assim limitações do estudo, apesar de não invalidar a expressividade dos dados apresentados. Por outro lado, Souza *et al.* (2010) demonstraram diferenças entre os sexos com maior prevalência da doença em machos, possivelmente devido a esses animais terem mais acesso à rua, sendo mais expostos a vetores e, conseqüentemente, à *E. canis*.

A análise dos dados demonstrou a alta frequência quanto ao histórico de carrapatos nos cães. Todos os carrapatos encontrados nos cães desse estudo foram identificados como *R. sanguineus* sensu lato, similar ao observado em populações caninas estudadas por Rotondano *et al.* (2015) e Dantas-Torres *et al.* (2018). De acordo com Tanikawa *et al.* (2013), o clima quente encontrado na região semiárida do Nordeste do Brasil é um fator importante que contribui para a disseminação dessa espécie de carrapato. *R. sanguineus* sensu lato é considerado menos dependente de *habitats* ricos em umidade para a sobrevivência, permitindo seu estabelecimento em regiões com balanço hídrico desfavorável (YODER *et al.*, 2006). Essa característica contribui para o estabelecimento desses carrapatos em regiões semiáridas, como a desse estudo.

A presença de carrapatos nos cães estudados não foi associada à infecção por *E. canis*. Tal fato, possivelmente ocorreu porque todos os cães amostrados apresentavam histórico de infestação recente ou ectoparitismo à consulta. Entretanto, *R. sanguineus* sensu lato permanece como o principal transmissor e fator de risco para a infecção por *E. canis* em cães no Brasil (TRAPP *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2007a).

Os sinais clínicos mais frequentes nos cães infectados por *E. canis* eram inespecíficos. Corroborando com os achados do presente estudo, Sousa *et al.* (2010) também relataram que os cães infectados com *E. canis* apresentaram sinais clínicos inespecíficos, como apatia, anorexia, febre, palidez de mucosas, distúrbios oftálmicos e tendências à hemorragia, além de esplenomegalia. Nenhum desses sinais clínicos foi associado à infecção por *E. canis* nos animais, o que reforça a importância da associação das alterações clínicoepidemiológicas e exames laboratoriais, visando estabelecer o diagnóstico confirmatório da enfermidade.

O diagnóstico é, em alguns casos, realizado pela combinação de sinais clínicos, hematológicos e sorológicos (COHN, 2003). Na fase aguda, a *nested* PCR pode detectar o DNA de *E. canis* antes que os testes sorológicos sejam capazes de determinar a presença de anticorpos

anti-*E. canis*. Além disso, a reação cruzada de DNA é incomum na *nested* PCR, enquanto que falsos positivos podem ocorrer na sorologia, devido à reação cruzada com outras espécies erliquiais ou a títulos persistentes de anticorpos após o tratamento. Sendo assim, os testes moleculares representam uma ferramenta disponível para otimizar o diagnóstico confirmatório da erliquiose canina e outras doenças transmissíveis por vetores, o que auxiliará na instituição de tratamento, medidas de controle e profilaxia mais adequadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho confirmou a ocorrência de *E. canis* em cães atendidos no HOVET/UFERSA, sendo a doença mais frequente em animais de até dois anos de idade. As alterações clínicas observadas nos animais infectados foram inespecíficas. Embora a ocorrência da doença não tenha sido associada ao histórico ou presença de carrapato, pode-se constatar a endemicidade de *R. sanguineus* sensu lato nos cães atendidos no HOVET/UFERSA, principal transmissor da erliquiose canina.

Ainda, a partir da realização desse trabalho foi possível implantar os procedimentos para diagnóstico molecular da erliquiose canina por meio de *nested* PCR na UFERSA. Ainda, o uso da técnica permitiu o diagnóstico da doença em cães com sinais clínicos inespecíficos e com histórico de parasitismo por carrapatos, representando uma ferramenta auxiliar relevante para confirmação da erliquiose canina na clínica de pequenos animais, auxiliando na tomada de decisão do tratamento.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 126–132, 2007a.
- AGUIAR, D. M. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007b.
- AKTAS, M. A. Survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 276–283, 2014.
- AKTAS, M. et al. Molecular detection of tickborne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 157, 2015.
- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros Ltda., 2002.
- ALMOSNY, N. R. P; MASSARD, C. L. Erliquiose em pequenos animais e como zoonose. In: ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 1 ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros Ltda., 2002. p. 14-56.
- ALVES, L. M. et al. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.
- ALVES, R. N. **Isolamento, propagação, caracterização genética e mecanismo de evasão de *Ehrlichia canis* in vitro**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- ANDRÉ, M. R. et al. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 6, n. 6, p. 779-786, 2015.
- ARAES-SANTOS, A. I. et al. Ectoparasite Infestations and Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**; v. 15, n. 11, p. 645-651, 2015.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia VIII: Chave para Famílias e para Gêneros e Espécies do Brasil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.2, n. 59, p. 121-129, 1961.
- ARAÚJO, F. R. et al. **DOT-ELISA para detecção de anticorpos contra *Ehrlichia canis***. In: _____. (Org.). **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 297-300, 2001.
- AZEVEDO, S. S. et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.
- BABO-TERRA, V. J. Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento das Hemoparasitoses de Cães e Gatos. **Ciência Animal Brasileira**. Supl. 5, I Congresso do Centro-Oeste de Veterinários de Pequenos Animais, novembro de 2004, Goiânia: UFG, p.73-77, 2004.

BARNEWALL, R. E.; RIKIHISA, Y. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of Ehrlichia chaffeensis infection in human monocytes with iron-transferrin. **Infect Immun**, v. 62, p. 4804-10, 1994.

BARROS-BATTESTI, D. M. et al. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies**. São Paulo: VOX/ICTTD-3/ Butantan, 223 p. 2006.

BERRADA, L.; TELFORD, S. Burden of tick borne infections on american companion animals. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 5, p. 175-182, 2009.

BORIN, S. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.

BRANDÃO, L. **Hemoparasitoses em cães e gatos: aspectos clínicos e laboratoriais**. Merial Saúde Animal, 2010.

BRANDÃO, L. P. et al. Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. **Vet Clin Pathol**, v. 35, n. 78, 2006.

BREITSCHWERDT, E. B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do Cão e do Gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p.422-429, 2004, p. 422-429.

BREITSCHWERDT, E. B. As Riquetisioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. V.1, 4 ed. São Paulo: Manole. Cap. 67, 1997, p. 543-49.

BREMER, W. G. et al. Transstadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.

BRITO, R. L. L. et al. Prevalência de Anticorpos Anti-Ehrlichia canis em cães nos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia. **XII Seminário de Iniciação Científica da UESC**. Salvador/BA, 2006.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. **Vet Res**, v. 35, p. 141146, 2004.

CARLOS, R. S. A. et al. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2011.

CARVALHO, F. S. et al. Epidemiological and molecular study of Ehrlichia canis in dogs in Bahia, Brazil. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet Parasitol**, v. 119, p. 73-86, 2004.

CHAVES, L. A. et al. **Erliquiose canina**. Monografia de Especialização em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, Qualittas Instituto de Pós-Graduação, Manaus, 2007.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Vet Clin N Am-Small**, 33:86384, 2003.

COSTA Jr, L. M. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Vet J**, v.174, p. 673-676, 2007.

COSTA, J. O. S. E. et al. Ehrlichia canis infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Esc Vet UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COUTO, C. G. Doença riquetsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders clínica de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003, p. 138-143.

DA SILVA, J. N. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-Ehrlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Vet Parasit**, Estados Unidos, v. 117, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S. et al. Erliquiose nos animais e no homem. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 191-201, 2001.

DAGNONE, A. S. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmatidae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Parasites and Vectors**, v. 3, p. 2-14, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (LATREILLE, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ehrlichia spp. Infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. **Parasites & Vectrs**, p. 11:139, 2018.

DANTAS-TORRES, F. et al. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best practices for preventing vector-borne diseases in dogs and humans. **Trends Parasitol**, v. 32, n. 1, p. 43-55, 2016.

DAY, M. J. One Health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites Vectors**, v. 4, n. 49, 2011.

DE AGUIAR, D. M. Erliquioses. In: JERICÓ, M. M.; DE ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. v. 2, 1 ed. Rio de Janeiro: Roca. Cap. 83, p. 2329-2349, 2015.

DOYLE, C. K. et al. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p. 504-510, 2005.

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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. In: Anemias regenerativas causadas por hemorragia ou hemólise. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.189-190.

FREIRE, D. A. C. et al. Abortion and fetal death in bitches due anemia caused by vector-borne diseases. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 69, n. 5, p. 1326-1330, 2017.

GONÇALVES, L. R. et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014.

GRAY, J. S. et al. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 593232, 2009.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3 ed., St. Louis, Elsevier, 1387 p., 2006.

GREGORY, C.; FORRESTER, S. O. Ehrlichia canis, E.equi, E. risticii infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990, p. 404-414.

GUEDES, P. E. B. et al. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brasil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 115-121, 2015.

HARRUS, S. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis ante treatment of experimental Ehrlichia canis infection. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 292-296, 2011.

HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Comp Cont Educ Pract**, v. 36, p. 431-47, 1997.

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

HARRUS, S. et al. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2140-2, 1998.

HASEGAWA, W. A. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. 2005. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HUXSOLL, D. L. et al. Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 6, n. 4, p. 220-225, 1970

IQBAL, Z. et al. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.7, p.1658-1662, 1994.

KAKOMA, I. et al. Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis: towards a universal case definition. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, New York, v. 916, p. 396-403, 2000.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 143, p.189-195, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean Spain and Portugal. **Rev MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clin Vet**, v. 30, p. 24-32, 2011.

LAPPIN, M. R. Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 1006 – 1011.

LOCATELLI, C. et al. Pulmonary hypertension associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Vet Rec**, v. 170, p. 676, 2012.

LOPES, M. G. et al. Ocorrência de *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e provável exposição a *Rickettsia amblyommatis* em cães e gatos de Natal, RN. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 151–156, 2019.

LOULY, C. C. B. et al. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no Município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MACHADO, R. Z. Ehrlichiose canina. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, supl.1, p. 53-57, 2004.

- MACHADO, R. Z. et al. Detection of Ehrlichia chaffeensis in Brazilian marsh deer (Blastocerus dichotomus). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 262-266, 2006.
- MAIA, C. et al. Bacterial and protozoal agents of canine vectorborne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. **Parasites Vectors**, v. 8, n. 138, 2015.
- MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doença transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, ano 23, n.137, p.15-23, 2004.
- MAVROMATIS, K. et al. The genome of the obligately intracellular bacterium Ehrlichia canis reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4015-23, 2006.
- McDADE, J. E. Ehrlichiosis a disease of animals and humans. **J. Infect. Dis.** Chiago, n.161, p.609-617, 1990.
- MELO, A. L. et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Med Vet Entomol**, v. 30, n. 1, p. 112-116, 2016.
- MELO, A. T. L. et al. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick borne Disease**, Berlin, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.
- MONGRUEL, A. C. B. et al. Molecular detection of vector borne pathogens in anemic and thrombocytopenic dogs in southern Brazil. **Braz J Vet Parasitol**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 505-513, 2018.
- MORAES-FILHO, J. et al. Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the Rhipicephalus sanguineus group for the bacterium Ehrlichia canis, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLoS One**, v. 10, n. 9, 2015.
- MORAIS, H. A. et al. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por Ehrlichia spp. **Clínica Veterinária**, v.48, p.28-30, 2004.
- MOREIRA, S. M. et al. Detection of Ehrlichia canis in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.
- MOREIRA, S. M. et al. Retrospective study (1998–2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.55, p.141-147, 2003.
- MORETTI, L. D. et al. Toxoplasma gondii genotyping in a dog coinfecting with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 48, p. 359-63, 2006.
- MUNDIM, A. V. et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by Hepatozoon sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol**, v.153, p.3-8, 2008.
- MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 91, 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E. et al. Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an update on the pathogenesis, diagnosis and management. *Israel J Vet Med*, v. 65, p. 129-35, 2010.

MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*, v. 138, p. 390–393, 2009.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. *Rev Bras Parasitol Vet*, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 75-79, 2010.

NEER, M. T. et al. Consensus statement on ehrlichial disease os small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 16, p. 309-315, 2002.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E.canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu* and *N. risticii* infections). In: Greene CE (editor). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 203-216, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Elsevier, p. 1360, 2006.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

NICHOLSON, W. L. et al. Zoonoses of people and pets in the USA: The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in parasitology*, v. 26, n. 4, 2010.

OLICHESKI, A.T. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para diagnóstico de protozoários do gênero Babesia (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero Ehrlichia (Ehrlich, 1888) em cães (Canis familiaris) no município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2003. 30 p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003. 30 p.

OLIVEIRA, L. S. et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, Supl. 2, p. 55-56, 2009.

ORIÁ, 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. 89p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

ORIÁ, A. P. et al. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis*. *Cienc. Rural*, v.34, p.1289-1295, 2004.

PEREZ, M. et al. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann N Y Acad Sci.** v.1078, p.110-117, 2006.

PINYOOWONG, D. et al. Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, p. 433-438, 2008.

RAMOS, C. A. N. et al. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de Ehrlichia canis e Anaplasma platys em cães. **Rev. Bras. Parasitol**, v. 18, supl. 1, p. 58-62, 2009.

RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 95-101, 2006.

ROTONDANO, T. E. et al. Survey of Ehrlichia canis, Babesia spp. and Hepatozoon spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 24, n. 1, p. 52-58, 2015.

SAINZ, A. M. A. et al. Prospective comparative study of e treatment protocols using Doxycycline or Imidocarb Dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 134-139, 2000.

SAITO, T. B. **Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos Rhipicephalus sanguineus experimentalmente infectados.** 2009. 127 p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SAITO, T. B. et al. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANTARÉM, V. A.; DE AGUIAR, D. M. Erliquiose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** v. 1, 1 ed. Rio de Janeiro: Roca. Cap. 9, p. 95-111, 2018.

SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys and Babesia spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SCHOTTHOEFER, A. M. et al. Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 7, p. 2147-2153, 2013.

SHERDING, R. G. Riquetsiose, erliquiose, anaplasrose e neoriquetsiose. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders, clínica de pequenos animais.** 3 ed. São Paulo: Roca. Cap.17, p.182-189, 2008.

SHIBATA, S. I. et al. New Ehrlichia species closely related to Ehrlichia chaffeensis isolated from Ixodes ovatus ticks in Japan. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1331-8, 2000.

SILVA, G. C. et al. Occurrence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in household dogs from northern Parana. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, V. L. D. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose Canina**. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SLOSS, M. W. et al. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole Ltda, 198p, 1999.

SOUSA, K. C. M. et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 4, p. 525-531, 2013.

SOUSA, V. R. F. et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

SOUZA, B. M. P. S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

STICH, R. W. et al. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Vet Parasitol**, v. 158, p. 256-73, 2008.

SUTO, Y. et al. First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. **Vet. Rec.**, London, v. 148, p. 809-811, 2001.

TANIKAWA, A. et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. **Res Vet Sci**, v. 94, n. 3, p. 474-477, 2013.

TILLEY, L. P. et al. **Consulta veterinária em 5 minutos**. 2 ed. Barueri: Manole, 2003.

TRAPP, S. M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet Parasitol**, v.140, p.223-230, 2006.

TURCHETTI, A. P. **Perfil de expressão gênica e níveis de citocinas em macrófagos caninos com diferentes graus de susceptibilidade à infecção por *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária - UFMG. 2014.

UENO, T. E. H. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

VARELA, A. S. Tick-borne Ehrlichiae and Rickettsiae of dog. Publicado por: **IVIS - International Veterinary Service**, Ithaca, Nova Iorque - EUA: IVIS, 2003. 8p.

VIEIRA, R. F. C. et al. Ehrlichiosis in brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

WANER, T. 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.

WARNER, C. K.; DAWSON, J. E. Genus-and species-level identification of Ehrlichia species by PCR and sequencing. In: PERSING, D.H. (Org.). **PCR Protocols for emerging infectious diseases: a supplement to diagnostic molecular microbiology- principles and applications**. Washington: ASM, p. 100-105, 1996.

WATANABE, M. et al. Experimental inoculation of beagle dogs with Ehrlichia species detected from Ixodes ovatus. **Vet Parasitol**, v. 136, p. 147–154, 2006.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent- antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dogs treated with doxycycline. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WITTER, R. et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmosse trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitos em Cuiabá, Mato Grosso. Semina: **Ciências Rurais**, Londrina, v. 34, n. 6, supl. 2, p. 3811-3822, 2013.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America – Small Practice**, v. 21, p. 75-98, 1991.

YODER, J. A. et al. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, Rhipicephalus sanguineus. **Med Vet Entomol**, v. 20, p. 365-372, 2006.

ZARDO, I. L.; PEREIRA, M. L. Segurança, eficácia e praticidade dos ectoparasiticidas para pulgas e carrapatos de cães e gatos. **Investigação**, v. 18, n. 4, p. 22-31, 2019.

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

IDENTIFICAÇÃO		
Animal N°:	Nome:	Ficha clínica:
Sexo:	Idade:	Raça:
Peso:	Outras informações:	
Tutor:		Fone:
Endereço:		
Suspeita clínica:		

HISTÓRICO DO ANIMAL			
<i>Questionamento</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Observações</i>
Tem acesso à rua?			
É vacinado?			
Convive com outros animais?			
Sadios?			
Histórico de carrapatos?			

EXAME CLÍNICO			
<i>Alteração clínica</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Observações</i>
Sem alterações			
Ectoparasitas			
Apatia			
Anorexia/hiporexia			
Perda de peso			
Desidratação			
Polidipsia			
Poliúria			
Hemoglobinúria			
Claudicação			
Onicogrifose			
Mucosas hipocoradas			
Icterícia			
Edema			
Petéquias			
Epistaxe			
Febre			
Conjuntivite			
Esplenomegalia			
Hepatomegalia			
Linfadenomegalia			

