

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Susana Elisa Rieck

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANTIGÊNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA
Ehrlichia canis EM UBERLÂNDIA, MG, BRASIL

Uberlândia

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANTIGÊNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA
Ehrlichia canis EM UBERLÂNDIA, MG, BRASIL

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial para obtenção do título de Doutora.

Doutoranda: Susana Elisa Rieck

Orientador: Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia
2011

Dedico esta tese

A Deus

Que sempre está ao meu lado, dando-me força, coragem e fé para seguir meu caminho.

À família

Que embora distante, está sempre presente na minha vida.

Aos animais

Que sempre ensinam muito além do que está escrito nos livros.

AGRADECIMENTOS

De coração, sou grata. Muitos ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. A grande maioria não conhecia, mas pela receptividade e carinho com que me acolheram para a execução desta tese tornaram-se amigos de verdade.

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Emílio Beletti, que aceitou o desafio sendo sua primeira orientada de doutorado. Em uma época difícil, em que decidi realizar este sonho, ele não vacilou, mesmo sem me conhecer, me adotou. Professor de grande conhecimento e simpatia, mas de temperamento difícil e com um coração enorme. Soube realmente orientar, que passos seguir, deixando toda responsabilidade pelo resultado alcançado, fazendo com que através dos anos, o aprendizado se concretizasse.

Ao Matias Pablo Juan Szabó, que através de seu contato me apresentou aos grandes estudiosos da erliquiose no Brasil e que por tantas vezes auxiliou e estimulou este estudo. Agradeço seus orientados também: Guilherme, que muito me ajudou, Marlene e Luiz Gustavo.

Marcelo Bahia Labruna, que não mediu esforços em partilhar seus conhecimentos, suas células e sua cepa, por muitas vezes solicitados e sempre atendidos.

Daniel Moura de Aguiar, quem ama estudar as erliquias. Simples, dedicado, estudioso e amigo. Sem seus conhecimentos que seria dessa tese?

Rosiane Nascimento Alves, que muito contribui com sua dedicação, paciência e persistência com a cultura celular, tornando-se também uma grande amiga.

Jussara, Rodrigo e Walkyria pela amizade de muitos anos e que me apresentaram ao Beletti, e sempre incentivaram esta longa jornada. Amigas Lili e Gabriela pela amizade.

Aos colegas do Instituto Federal do Triângulo Mineiro que apoiaram a conclusão do doutorado, em especial, ao diretor Ruben Benvegnú Minussi e aos colegas de todos os dias: Paulo Roberto, Inês, Nágila, Cristiane, Fernanda e Rodrigo.

Aos colegas do laboratório de Histologia pela convivência alegre e harmônica de tantos dias: Marcelo, Fabrício, Rui, Mariane, Jucélia, Loiane, Estér, Moline, Benner,

Bellisa, Angélica, Letícia, Belchiolina, Juliana, Mariana, Andressa, Priscila, Fernanda e Lígia.

Ao curso de pós graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, secretárias Lucineide e Lucélia, coordenadora Eloísa, pelo entusiasmo em manter o curso e melhorá-lo a cada dia.

Dra. Daise Rossi pela cessão do espaço do laboratório, pela simpatia e amizade. Aos seus orientados, Roberta e Eliane, e colaboradora Francesca.

Ao laboratório de Genética, Dr. Luiz Ricardo Goulart, Dr. Carlos Ueira, Dr. Carlos Prudêncio e todos seus orientados pela ajuda, paciência e presteza em ensinar.

Ao Professor Dr. Antonio Vicente Mundim, ao residente Pablo, à veterinária Suzana, bem como todos colaboradores do Hospital Veterinário da UFU que cederam amostras para este estudo.

Ao Centro de Controle de Zoonoses, pelo seu coordenador Pajuaba, Jean, Ana Cláudia e todos colaboradores do canil e laboratório, especialmente Roberto e Juvenildo.

Dra. Deise, Dâmaso e Ana Cláudia da Imunologia, pelos ensinamentos de cultivo celular.

Às minhas alunas Iara e Roberta que por muitos dias me acompanharam na colheita de sangue dos cães.

Ao professor Dr. Rogério pela análise estatística.

Aos cães, grandes ou pequenos, meigos ou bravos, com pedigree ou vira latas que cederam amostras de sangue ao bem da ciência, em especial Faro, Preta e Pinta, que inúmeras vezes foram necessários. Lembrando também da Hannah, que há vários anos se foi, mas através dela, fiz o primeiro diagnóstico de mórula em esfregaço sanguíneo.

“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes”.

Isaac Newton

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
Fundamentação Teórica	12
I. Introdução	13
II. Objetivos Gerais	15
III. Fundamentação teórica	16
III.I. O agente	16
III.II. O vetor	17
III.III. A transmissão	19
III.IV. O desenvolvimento intracelular da <i>Ehrlichia spp.</i>	20
III.V. A doença	21
III.VI. O diagnóstico	23
III.VII. A ocorrência	27
III.VI.I A ocorrência em Uberlândia/ MG	29
Capítulo I “Sequenciamento do gene 16S rRNA do isolado Uberlândia de <i>E. canis</i> ”	32
1. Introdução	33
2. Objetivos	35
3. Materiais e Métodos	36
3.1 Reação em cadeia da polimerase	36
3.2 Purificação	37
3.3 Sequenciamento	37
3.4. Análises <i>in silico</i>	37
3.5. Números de acesso ao GenBank	37
4. Resultados	39
5. Discussão	41
6. Conclusões	43
Capítulo II “Comparação antigênica de dois isolados brasileiros de <i>E. canis</i> ”	44
1. Introdução	45
2. Objetivo	48
3. Materiais e Métodos	49
3.1 Obtenção de amostras de soro de cães	49
3. 2 Propagação de cepas de <i>E. canis</i>	49

3.3 Confeção de lâminas para RIFI	50
3.4 Reação de imunofluorescência indireta	51
3.5 Análise estatística	52
4. Resultados	53
5. Discussão	56
6. Conclusões	59
Capítulo III “Estudo epidemiológico da prevalência de anticorpos de <i>E. canis</i> na população canina de Uberlândia, Minas Gerais”	60
1. Introdução	61
2. Objetivos:	64
2.1 Objetivo geral	64
2.2 Objetivos específicos	64
3. Materiais e Métodos	65
3.1 Obtenção das amostras de soro de cães	65
3.2 Propagação de cepas de <i>E. canis</i>	66
3.3 Confeção de lâminas para RIFI	66
3.4 Reação de imunofluorescência indireta	66
3.5 Análise estatística	67
3.6 Aprovação pelo comitê de ética	69
4. Resultados	70
5. Discussão	78
6. Conclusões	83
Considerações Finais	84
Referências	86
ANEXOS	100

RESUMO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença com ampla distribuição no Brasil e mundo. O agente causador é uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória denominada *Ehrlichia canis*, a qual para infectar o cão precisa do auxílio de um vetor, o *Rhipicephalus sanguineus*. No ano de 2009 foi realizado o primeiro isolamento deste agente em Uberlândia a partir de um cão doente. Este isolado foi propagado *in vitro* e o gene 16S rRNA seqüenciado para sua caracterização e comparação com outros isolados. O sequenciamento do 16S rRNA confirmou a identificação do isolado como *E. canis* e apresentou alta homologia com demais cepas e isolados depositados no GenBank. Também foi avaliada a habilidade antigênica na reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando como antígeno este e outro isolado brasileiro, o São Paulo, e soros caninos das duas cidades. Quanto à positividade, os soros de cães de São Paulo e de Uberlândia foram concordantes na RIFI com ambos antígenos, apesar de grandes variações no título final. Pela análise do índice *Kappa* foi constatado que os dois antígenos possuem respostas diferentes, sendo que os animais de São Paulo, que provavelmente adquiriram anticorpos contra a cepa isolada daquela região, respondem de forma similar às erlíquias de Uberlândia. Já os animais que provavelmente entraram em contato com a *E. canis* de Uberlândia produziram anticorpos com afinidade maior para o antígeno Uberlândia. Os isolados São Paulo e Uberlândia apresentaram sensibilidade diferente ao diagnóstico da *E. canis* por RIFI, mas não o suficiente para gerar falsos negativos ou positivos. A prevalência da doença na população canina de Uberlândia foi verificada utilizando a RIFI e avaliando prováveis fatores que possam influenciar na sua ocorrência. A prevalência da EMC em Uberlândia foi alta, sendo que de 400 amostras de soro, 211 (52,8%) cães foram positivos. A observação pelo proprietário dos cães do contato com carrapatos não influenciou significativamente a ocorrência da EMC ($p= 0,419$). Houve uma tendência ($p= 0,057$) dos machos serem mais positivos que as fêmeas. Os cães com mais de um ano de idade foram mais positivos (56,3%, $p= 0,002$). Cães errantes também foram mais positivos (68,8%) quando comparados com cães destinados a doação (34,1%) e com dono (54,8%) ($p= 0,002$). O local de residência também influenciou na

positividade dos cães, sendo a positividade dos cães dos distritos (76,7%) maior que na cidade (55,9%) e na zona rural (39,2%) ($p= 0,0001$). As diferenças encontradas entre as localidades podem ser explicadas pela baixa renda econômica nos distritos quando comparada com a cidade, com conseqüente menores cuidados com os cães. Uberlândia é endêmica para EMC, sendo que cães com mais de um ano de idade, errantes e que residem em localidades com menor desenvolvimento econômico tem maior predisposição para a infecção por *E. canis*.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, cães, erliquiose monocítica canina, 16S rRNA, reação de imunofluorescência indireta, prevalência, Uberlândia

ABSTRACT

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a disease with a extensive distribution in Brazil and the world. The etiologic agent is a gram negative obligate intracellular bacterium called *Ehrlichia canis*, which needs of the vector, *Rhipicephalus sanguineus* to infect the dog. In 2009 it was carried out the first isolation of this agent in Uberlandia from a sick dog. This isolate was propagated in vitro and the 16S rRNA gene was sequenced for characterization and comparison with other isolates. Sequencing of 16S rRNA confirmed the identification of the isolate as *E. canis* and showed high homology with other strains and isolates deposited in GenBank. We also evaluated the antigenicity in indirect immunofluorescence assay (IFA), using this antigen and other Brazilian isolate, called São Paulo, and canine sera from both cities. The results by IFA for sera of dogs from São Paulo and Uberlândia were concordant with antigens, despite the variation in the final title. By analyzing the *Kappa* coefficient, I was noted that the two antigens have different answers, being that the animals from São Paulo, who probably acquired antibodies against the strain isolated from that region, respond similarly to ehrlichia Uberlandia. However, the animals that probably came into contact with *E. canis* from Uberlândia produced antibodies with higher affinity for antigen Uberlândia. The São Paulo and Uberlândia isolated had different sensitivity to the diagnosis of *E. canis* by IFA, but not enough to generate false negatives or positives. The prevalence of the disease in canine populations from Uberlândia was tested using the IFA, as well as, probable factors that may influence its occurrence were evaluated. The prevalence of CME was high in Uberlandia, being that 211 (52.8%) dog sera were positive in 400 serum samples. The observation by the owner of the contact of the dogs with ticks did not significantly influenced the occurrence of CME ($p = 0.419$). There was a trend ($p = 0.057$) of males to be more positive than females. Dogs over one year old were more positive (56.3%, $p = 0.002$). Stray dogs were also more positive (68.8%) compared with dogs for donation (34.1%) and with owner (54.8%) ($p = 0.002$). The place of residence also influenced the positivity, being that the dogs from the districts (76.7%) have higher positivity than from the city (55.9%) and rural area (39.2%) ($p = 0.0001$). The differences between the localities can be explained by low economic income of the

districts when compared with the city, resulting in smaller care of dogs. Uberlândia is endemic to CME, and dogs over one year old, wandering and living in cities with less economic development have a greater predisposition to *E. canis* infection.

Keywords: *Ehrlichia canis*, dogs, canine monocytic ehrlichiosis, 16S rRNA, indirect immunofluorescence, prevalence, Uberlândia



Fundamentação Teórica

I. Introdução

O cão se aproximou do homem no início das civilizações com o intuito de aproveitar seus restos alimentares e sobreviver. Desde então, uma longa história de amizade e companheirismo começou. Para alguns a convivência entre cães e homens é tão afetuosa como a de pais e filhos. Alguns cães tornaram-se humanizados, pois não gostam de outros cães ou animais, apenas de humanos. E muitas pessoas, rendem-se, diariamente, a lambidas, latidos e olhares carentes de seus amados cães.

Além de desenvolver sentimento de amor com seu dono, os cães possuem inúmeras funções na sociedade. Existem os cães guia de cegos, cães farejadores, cães que trabalham em fazendas e que auxiliam na defesa pessoal. Então, esta população canina necessita de cuidados diários, alimentação, proteção e higiene. E assim como são fortes e felizes, eles também são vulneráveis. Vários agentes, infecciosos ou não, os atingem diariamente, os enfraquecendo, adoecendo e muitas vezes matando estes queridos animais. A necessidade de conhecimento das doenças caninas aumenta dia a dia pela imensa população de cães e seus preocupados e zelosos donos que não poupam esforços para protegê-los.

Entre as inúmeras doenças caninas está a erliquiose monocítica canina (EMC) causada pela *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935) e transmitida pelo *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (LATREILLE, 1806). O seu primeiro relato foi na Algéria em 1935 por Donatien e Lestoquard sendo denominada *Rickettsia canis*. Destaque maior desta doença ocorreu durante a guerra do Vietnã quando muitos casos surgiram em cães do exército americano presentes no Sudoeste Asiático. Naquela época era conhecida por pancitopenia tropical canina, em consequência às alterações hematológicas observadas nos animais doentes (HILDEBRANDT et al., 1970).

Atualmente, a doença tem uma expansão mundial, ocorrendo em todos os países com temperatura tropical e alguns de clima temperado. Todos os anos, grande número de animais adoecem e muitos acabam morrendo em decorrência da EMC, sendo considerada uma das principais enfermidades infecciosas de cães no país (OLIVEIRA et al., 2000; SZABÓ et al., 2001; MOREIRA et al., 2003, DANTAS-TORRES, 2008).

O parasitismo de humanos pelo *R. sanguineus* do cão, embora não seja comum, já foi observado no Brasil (DANTAS-TORRES, FIGUEIREDO e BRANDÃO-FILHO, 2006). Na Venezuela foi confirmada a infecção de cães e humanos pela mesma cepa de *E. canis* e tendo o *R. sanguineus* como vetor (UNVER et al., 2001). Aqui, no Brasil, onde a *E. canis* e o *R. sanguineus* têm ampla distribuição na população canina, o homem com seu contato íntimo com cães está sujeito ao risco zoonótico (DANTAS-TORRES, 2008). Existem indícios sorológicos em cães (GALVÃO et al., 2002) e humanos (COSTA, BRIGATE e GRECCO, 2005, SPOLIDORIO et al., 2010), clínicos em humanos (COSTA et al., 2006) e moleculares no veado do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (MACHADO et al., 2006), da presença da *E. chaffeensis*, causadora da erliquiose monocítica humana, no Brasil. Assim, estudos sobre o diagnóstico das erliquioses em humanos e animais, caracterização das cepas locais e das áreas de maior prevalência no Brasil são necessários e relevantes.

Nos últimos anos, estudos envolvendo a *E. canis* em Uberlândia foram desenvolvidos no Departamento de Histologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. Macedo (2007) realizou a comparação entre o diagnóstico citológico e reação em cadeia da polimerase (PCR), bem como fez avaliação histopatológica e ultraestrutural de casos suspeitos de EMC. A eficácia quimioterápica de *Artemisia annua* e de doxiciclina sobre o desenvolvimento da *E. canis in vitro* foi estudada por Genaro (2009). O isolamento da cepa Uberlândia de *E. canis* em 2010 foi obtida de um cão doente. Também foi avaliado mecanismos da evasão envolvidos *in vitro* utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (ALVES, 2010). Este ano, Levenhagen (2011), observou mecanismos de sinalização celular na internalização da *E. canis*. Portanto, os objetivos deste estudo dão continuidade aos trabalhos anteriores, auxiliando no conhecimento da infecção por *E. canis* em cães de Uberlândia.

II. Objetivos Gerais

Caracterização molecular do gene 16S ribossomal RNA (16S rRNA) do isolado de Uberlândia de *E. canis* obtido por Alves (2010).

Comparação de antígenos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) obtidos a partir dos isolados São Paulo e Uberlândia de *E. canis*.

Estudo epidemiológico utilizando a pesquisa de anticorpos contra *E. canis* pela RIFI em cães saudáveis no município de Uberlândia/ Minas Gerais (MG).

III. Fundamentação teórica

III.I. O agente

A *E. canis* é o agente primário causador da EMC em cães domésticos e selvagens por todo o mundo onde ocorre seu vetor, o carrapato marrom do cão, *R. sanguineus*. Este agente é uma α proteobactéria, gram negativa pertencente à família *Anaplasmataceae*, sendo ela parasita intracelular obrigatória (ANDEREG e PASSOS, 1999; MORAIS et al., 2004), com tropismo por monócitos e macrófagos, onde formam microcolônias dentro de vacúolos citoplasmáticos ligados a membrana chamados mórulas (YU, McBRIDE, WALKER, 2007).

Antes do estudo de Dumler et al. (2001) era chamada de *Rickettsia canis*, mas a partir de então, pelos aspectos morfológicos e genéticos foi proposta a atual taxonomia. Este estudo sugeriu que a ordem *Rickettsiales* possui duas famílias, *Rickettsiaceae*, contendo as riquetsias (*Rickettsia*, *Orientia*) que ocupam um compartimento citoplasmático e *Anaplasmataceae* que contém as erlíquias (*Neorickettsia*, *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*) que ocupam compartimento intravacuolar dentro das células infectadas do hospedeiro.

O gênero *Ehrlichia* consiste de cinco espécies reconhecidas incluindo *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* e uma espécie anônima isolada do carrapato *Ixodes ovatus* [designada *Ixodes ovatus ehrlichia* (IOE)] (YU, McBRIDE, WALKER, 2007).

Durante muito tempo a *Ehrlichia* spp. foi considerada espécie específica, porém recentemente esse conceito foi mudado, uma vez que espécies de *Ehrlichia* spp. têm sido diagnosticadas em hospedeiros não específicos (MACHADO et al., 2006), como ocorreu na Venezuela, onde *E. canis* foi encontrada parasitando pessoas, cães e carrapatos (UNVER et al., 2001). Em gatos domésticos já foi detectada pela PCR no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009) e Estados Unidos (BREITSCHWERDT et al., 2002). No Brasil em felinos silvestres de cativeiro também já foram detectados anticorpos contra *E. canis* e amplificado o gene 16S rRNA (ANDRÉ et al., 2010). Recentemente, um novo genótipo de *Ehrlichia* foi encontrado em bovinos, que pela análise do gene 16S rRNA, apresenta similaridades filogenéticas com *E. canis* mas com um genótipo distinto, localizando-se em um

clado próximo. Este achado representa a primeira infecção natural de bovinos por *Ehrlichia* na América do Norte, embora ainda não se conheça seus efeitos patogênicos e zoonóticos (GAJADHAR et al., 2010).

O genoma da *E. canis* já foi descrito a partir da cepa Jake e disponibilizado no GenBank possuindo um único cromossoma circular que mede 1.315.030 nucleotídeos. Um total de 984 genes foram identificados incluindo uma cópia de cada gene rRNA (5S, 16S e 23S). A sequência genômica prevê recursos necessários para detalhada análise deste patógeno através do entendimento das bases moleculares da interação parasita hospedeiro, pois sendo uma bactéria gram negativa, mas deficiente em componentes estruturais, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, desenvolveu proteínas estruturais complexas na membrana externa como estratégia adaptativa deste organismo, auxiliando na evasão da resposta imune (MAVROMATIS et al. 2006).

A diversidade das proteínas imunodominantes de *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* versus a conservação das proteínas imunodominantes de *E. canis* sugerem que *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* sofreram maior pressão do sistema imune do hospedeiro que *E. canis*. Entretanto, a restrição genética e divergência de cada espécie de *Ehrlichia* podem ser causadas pelas diferenças nos organismos de hospedeiros e vetores. *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* se adaptaram à múltiplos vetores e hospedeiros e são mais diversificados. Em contrapartida, a *E. canis* é transmitida principalmente pelo *R. sanguineus*, e está restrita aos cães, tendo menor variação e plasticidade. Outra possibilidade é que essas espécies de *Ehrlichia* com mais diversidade, como *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* poderiam ter aparecido mais cedo, e as outras com menos diversidade, como *E. canis*, podem ter evoluído mais recentemente (YU, McBRIDE, WALKER, 2007).

III.II. O vetor

O *R. sanguineus* está presente em todos os continentes, onde parasita principalmente o cão doméstico. No Brasil, nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por este carrapato em cães vem aumentando (LABRUNA, 2004). É um carrapato com hábitos nidícolas (do latim nidi=ninho; cola=que permanece), pois em todas as fases de desenvolvimento em vida livre passa em frestas e buracos dos locais onde os cães vivem. O seu ciclo compreende

as fases de larva, ninfa e adulta; este último é o único estágio com dimorfismo sexual. Cada estágio parasita o hospedeiro por alguns dias (três a sete dias para larvas e ninfas, cinco a dez dias para fêmeas adultas e mais de 15 dias para machos adultos), quando se alimenta principalmente de sangue, mas também de linfa e restos tissulares da derme e/ou epiderme lesada por diversas enzimas proteolíticas secretadas pela saliva do carrapato. No final do período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para fazer, no ambiente, a ecdise para o próximo estágio evolutivo, ninfas e adultos, respectivamente. As fêmeas ingurgitadas que foram fertilizadas pelos machos sobre o hospedeiro, se desprendem deste para fazerem postura de ovos no ambiente. Cada fêmea pode colocar de 1000 a 3000 ovos, que depois de incubados por algumas semanas dão origem as larvas. Os machos, que ficam sobre o hospedeiro por vários dias ou semanas, não ingurgitam ou aumentam de tamanho, podendo fertilizar várias fêmeas. A duração das fases de vida livre é dependente das condições climáticas, mas no Brasil não existem estudos a respeito (LABRUNA, 2004).

Como o cão não desenvolve imunidade efetiva contra o *R. sanguineus*, este se torna seu principal hospedeiro, embora possa parasitar gatos, coelhos e canídeos selvagens (SZABÓ et al., 1995, STITCH et al., 2008). Em Uberlândia, em um estudo epidemiológico, 37% dos cães apresentaram infestação por carrapatos e o *R. sanguineus* foi prevalente nas infestações de cães urbanos e de áreas rurais (SZABÓ et al., 2010), sugerindo sua importância na transmissão de doenças transmitidas por carrapatos, como no caso da erliquiose.

O parasitismo humano pelo *R. sanguineus* é incomum, mas no Brasil já foi descrito (DANTAS-TORRES, FIGUEIREDO e BRANDÃO-FILHO, 2006), destacando assim a importância do seu papel zoonótico na disseminação de doenças. Na Venezuela, os carrapatos parasitavam cães e humanos, transmitindo a estes a *E. canis* (UNVER et al., 2001).

Dantas-Torres (2008) alerta que no Brasil são encontradas nove patógenos de cães que utilizam o carrapato como vetor, sendo a EMC uma das mais importantes. O autor acredita que as mudanças climáticas, o desmatamento, a urbanização rápida e o uso indiscriminado de substâncias químicas causam impacto significativo na dispersão de vetores como o *R. sanguineus* e suas doenças.

III.III. A transmissão

O carrapato se infecta ao ingerir sangue, com leucócitos parasitados de animais doentes. Isto, geralmente, ocorre na segunda ou terceira semana de infecção no cão, pois é a fase aguda da doença, onde existe maior percentagem de leucócitos infectados. No *R. sanguineus*, a *E. canis* multiplica-se na glândula salivar (LEGATZKI e JORGE, 2002). Os microorganismos podem persistir nos carrapatos por mais de cinco meses (SWANGO et al., 1992). Nas fases subclínicas e crônicas da EMC no cão a parasitemia é muito baixa, impedindo a efetiva transmissão (STITCH et al., 2008).

A transmissão ocorre de forma intraestadial e transestadial, ou seja, no mesmo estágio ou entre estágios de larva, ninfa e adulto. Não há transmissão transovariana e, a passagem da infecção de um cão para outro é diretamente atribuída à presença do vetor (GROVES et al., 1975). O macho também, na forma de ninfa ou adulto está envolvido na transmissão da *E. canis*, podendo fazê-la de forma experimental sem a presença da fêmea (BREMER et al., 2005). O *R. sanguineus* macho, pertencente ao grupo Metastriata, necessita de sangue para sua maturação sexual e antes da cópula sobre o hospedeiro. Ele também persiste um tempo maior sobre o hospedeiro, mesmo depois de copular, tornando-se um importante disseminador da erliquiose (STITCH et al., 2008).

Aguiar et al. (2007a) estudaram a prevalência de carrapatos infectados em quatro populações diferentes que tinham contato com pelo menos um cão infectado e encontraram uma baixa Prevalência Mínima de Infecção (<7%), concluindo que não é em todo repasto sanguíneo que o *R. sanguineus* se infecta em cães infectados por *E. canis*. Cinquenta a 70% de cães não infectados colocados com cachorros experimentalmente infectados com *E. canis* e depois parasitados com *R. sanguineus* durante a fase aguda da doença adquiriram com êxito a infecção (BREMER et al., 2005).

Outra forma de transmissão da doença é a transfusão sanguínea de um cão infectado para um cão suscetível. A transmissão pela transfusão sanguínea proveniente de cães cronicamente infectados é descrita por Swango et al.(1992).

III.IV. O desenvolvimento intracelular da *Ehrlichia spp.*

O ciclo de desenvolvimento da *E. canis* em monócitos caninos tem três estágios que podem ser observados microscopicamente. No primeiro os corpos elementares entram nos monócitos por fagocitose (NYNDO et al., 1971; DAVOUST, 1993; RISTIC e HOLLAND, 1993). Segundo NYNDO et al. (1971) a fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo, onde a multiplicação ocorre por divisão binária.

Conforme Davoust (1993), a primeira fase do ciclo é caracterizada pela penetração no monócito pelo corpo elementar, que se multiplica até atingir um tamanho de 0,2 a 0,6 μm , fase com duração de dois dias. Já para Ristic e Holland (1993) o primeiro estágio é representado por corpos elementares pequenos de 0,2 a 0,4 μm de diâmetro.

Em um segundo estágio, do terceiro ao quinto dia pós-infecção, um pequeno número de corpos elementares em agrupamentos de 1 a 2 μm de diâmetro, denominados corpúsculos iniciais são observados como inclusões pleomórficas (RISTIC e HOLLAND, 1993). Para Davoust (1993) o corpo inicial é um amontoado de corpos elementares acoplados com tamanhos que variam de 0,4 a 2 μm , todavia Ristic e Holad (1993) descreveram que os corpos iniciais são levemente maiores (0,5 a 4 μm de diâmetro).

E finalmente, no terceiro estágio, entre o sétimo e o décimo segundo dias subseqüentes, ocorrem crescimentos adicionais e multiplicações e os corpos iniciais transformam-se na mórula, uma aglomeração de corpos elementares, que na microscopia óptica têm aspecto de “amora” que tipificam o gênero (NYNDO et al., 1971). Para Ristic e Holland (1993) as mórulas são corpúsculos de inclusão maiores inalteráveis (4 a 6 μm de diâmetro). Muitas mórulas podem coexistir em um monócito e cada mórula contém vários corpos elementares. Depois de 3 ou 4 dias, as mórulas são separadas do citoplasma pelos vacúolos e os corpos elementares são liberados pela ruptura do monócito, ou então são liberadas por exocitose e o ciclo infeccioso é repetido (NYNDO et al., 1971, DAVOUST, 1993).

III.V. A doença

A doença é uma desordem multisistêmica com sinais comuns com outras infecções como depressão, letargia, anorexia e perda de peso. Quando sangramentos estão presentes, estes se manifestam como epistáxis, petéquias e equimoses na pele. Esplenomegalia e linfadenopatia também são comuns no exame clínico dos cães doentes. Entre os achados laboratoriais, os mais frequentes são trombocitopenia e anemia (NEER e HARRUS, 2006).

A doença é caracterizada por três fases definidas como: aguda, subclínica e crônica, que se desenvolvem após um período de incubação de 8 a 20 dias (ANDEREG e PASSSOS, 1999). Vários fatores podem influenciar o curso e o resultado da infecção pela *E. canis*, como o tamanho do inóculo, a cepa envolvida e a presença de outra doença transmitida por carrapato (NEER e HARRUS, 2006).

A fase aguda da erliquiose é variável quanto à duração (2 a 4 semanas) e à gravidade (suave à severa). O microorganismo replica-se nas células mononucleares, principalmente no sistema fagocítico mononuclear, linfonodos, baço e medula óssea, resultando em hiperplasia dessa linhagem celular e organomegalia (linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia). A trombocitopenia decorrente da destruição periférica de plaquetas, acompanhada ou não de anemia e leucopenia (ou leucocitose) é comum durante esta fase (SWANGO et al., 1992).

Os sinais clínicos mais frequentes na fase aguda são apatia, anorexia, depressão, febre, perda de peso, cianose, estertores pulmonares, equimoses e vômitos. Todas essas alterações levam ao aumento dos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, proteína c-reativa (CRP) e alfa-1-ácido glicoproteínas (AAG). Assim, a pesquisa dos níveis de CRP e AAG auxilia na avaliação da gravidade dos danos inflamatórios do fígado (ANDEREG e PASSSOS, 1999). Couto (1998) considera que os animais na fase subclínica ficam assintomáticos, apresentando apenas alterações hematológicas e bioquímicas suaves. Casos de glomerulonefrite foram, também, descritos nesta fase.

A fase subclínica instala-se quando o cão sobrevive à fase aguda. Esta fase está associada com a persistência da *E. canis* no hospedeiro, demonstrada pela PCR e por altos níveis de anticorpos no soro. Isso sugere constante estimulação do sistema imune por antígenos com duração de aproximadamente seis a nove

semanas, progredindo para a fase crônica (ANDEREG e PASSOS, 1999). Animais infectados e sadios podem servir como reservatórios da doença, entretanto é incerto como e quando o cão na fase subclínica irá progredir para a fase crônica (NEER e HARRUS, 2006).

Nesta fase os pacientes ficam assintomáticos. Em alguns casos observam-se complicações como depressão, agravamento da perda de peso, mucosas pálidas, hemorragias, infecções secundárias e edema nos membros. Alterações neurológicas como ataxia, disfunção motora, hiperestesia localizada e tremores são provavelmente causados por infiltração celular ou devido a hemorragias nas meninges ou no parênquima cerebral e na medula espinhal (COUTO, 1998 e SWANGO, et al., 1992).

Os sinais da fase crônica podem ser a perda de peso, pirexia, sangramento espontâneo, palidez devido à anemia, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, uveíte anterior e/ ou posterior, sinais neurológicos causados por meningoencefalomielite e edema intermitente de membros (COUTO, 1998). A erliquiose crônica ocorre em cães que não conseguem eliminar o agente. Ocorre, ainda, hipergamaglobulinemia pela persistente estimulação antigênica, sendo sugestiva de resposta imune mediada por células (SWANGO, 1992).

Os sintomas clínicos na fase crônica são reflexos das alterações fisiopatológicas resultantes da grave anemia e da infiltração perivascular de muitos sistemas orgânicos com células linforeticulares e plasmócitos (SWANGO, 1992). Couto (1998) alerta que os sinais clínicos, os sintomas e as anormalidades laboratoriais nos cães com erliquiose crônica podem lembrar um mieloma múltiplo ou leucemia linfocítica crônica.

As anormalidades hematológicas e bioquímicas na fase crônica são, geralmente, acentuadas e incluem mono, bi ou pancitopenia devido à hipoplasia da medula óssea, plasmocitose, linfocitose ocasionalmente composta de grandes linfócitos granulares, hiperglobulinemia causada por gamopatia policlonal (ou menos freqüentemente monoclonal), hipoalbuminemia e proteinúria (COUTO, 1998).

A trombocitopenia é um achado freqüente em cães com erliquiose. Utilizando amostras de cães atendidos em hospital veterinário de uma área endêmica no Brasil, Bulla et al. (2004) encontraram relação entre animais positivos e grau de trombocitopenia, sendo que o maior número de cães com erliquiose apresentavam a

menor contagem plaquetária e apenas 1,4% dos cães com contagem normal apresentou positividade ao PCR de *E. canis*.

Em um estudo de 100 casos clínicos em Israel, os sinais clínicos mais comuns em cães com EMC foram: depressão e letargia, linfadenomegalia, febre, dispnéia, anorexia, palidez de mucosas e sangramentos. E, entre os achados laboratoriais, os mais freqüentes foram: trombocitopenia, anemia, anemia normocítica normocrônia, linfopenia e leucopenia. Os cães da raça pastor alemão e ou que apresentavam anemia e ou leucopenia severas, pancitopenia, e tendência a hemorragias são os que apresentam os piores prognósticos de sobrevivência (HARRUS et al., 1997). Em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HOVET-UFU) em Uberlândia (BORIN et al., 2009), a apatia, anorexia/hiporexia, vômito, secreção óculo nasal e esplenomegalia foram os achados mais frequentes.

Sinais clínicos de uveíte são encontrados em cães com erliquiose em qualquer fase da doença (ORIÁ et al., 2004). Afecções oculares causadas pela EMC, principalmente uveíte bilateral anterior, em cães que residem em áreas endêmicas devem ser consideradas (KOMNENOU et al., 2007). Neer e Harrus (2006) também relatam a ocorrência de lesões oftálmicas, sendo as uveítes as mais frequentes.

Harrus et al. (1998) demonstraram pela infecção experimental da EMC, que os cães podem abrigar a *E. canis* durante a fase subclínica por anos e depois a eliminar sem desenvolver a forma crônica.

III.VI. O diagnóstico

Melhoria nas técnicas de diagnóstico da EMC, bem como conhecimento sobre a doença e a expansão geográfica da sua ocorrência possibilitam o aumento da identificação de casos. Muitos são os métodos atualmente utilizados: o clínico auxiliado pelo hemograma completo, métodos indiretos pela pesquisa de anticorpos e métodos diretos como citológico com a observação de mórulas em leucócitos, moleculares pela amplificação do DNA e o isolamento em cultivo celular.

Um diagnóstico presuntivo da doença geralmente é baseado na história e sinais clínicos. Trombocitopenia e anemia não regenerativa são os achados hematológicos mais freqüentes, tanto nos casos agudos, como nos casos crônicos.

A anemia pode ser regenerativa, quando há infecção concomitante com *Babesia canis*. Pancitopenia e hipoplasia da medula óssea são frequentemente encontradas nos casos crônicos (SWANGO et al., 1992).

Na fase aguda da doença, durante a bacteremia, a observação da inclusão citoplasmática da *Ehrlichia*, formando a mórula, é identificada em pequena porcentagem de leucócitos e por um curto período (BOUNOUS, HOSKINS e BOUDREAUX, 1992). Desta forma pode-se visualizar o agente em esfregaços de sangue total e periférico. As mórulas coram-se em púrpura-azulada com coloração de Giemsa e são encontradas transitoriamente e em pequenos números na fase precoce da infecção. A extensão de sangue periférico de margem de orelha externa mostrou-se como uma técnica satisfatória para a identificação de *Ehrlichia* spp. (NEER e HARRUS, 2006, MACEDO, 2007).

A identificação do microorganismo na citologia por aspiração com agulha fina do baço, dos linfonodos e dos pulmões é possível, mas extremamente improvável. Nessas amostras citológicas observa-se plasmocitose frequentemente (COUTO, 1998). Moreira, Machado e Passos (2005) relataram a identificação de mórulas em monoblastos e monócitos maduros da medula óssea 13 dias após a infecção experimental com cepa de *E. canis*. Sugerindo os autores que, devido à alta parasitemia encontrada nas amostras colhidas, esta pode ser uma forma de diagnóstico, mas a invasividade do procedimento torna seu uso clínico restrito.

O diagnóstico pode ser feito por métodos indiretos pela pesquisa de anticorpos. Na RIFI os anticorpos anti-*E. canis* podem ser detectados entre duas a três semanas após a infecção e se elevam para níveis máximos por volta dos três meses após a infecção (SWANGO et al., 1992). Os sinais clínicos da doença podem aparecer antes do desenvolvimento dos anticorpos e a RIFI pode ser negativa em animais infectados recentemente.

A maioria dos laboratórios relata que títulos séricos refletem a quantidade de anticorpos presentes na amostra de soro. No entanto, títulos não se correlacionam com a duração da infecção ou a gravidade da doença. Alguns laboratórios usam diferentes pontos de corte para diferenciar os positivos dos negativos. Assim o título mais apropriado é desconhecido no momento. Há um consenso que títulos 1:80 devem ser considerados suspeitos e o teste sorológico repetido dentro de 2-3 semanas, e a PCR e o *western immunoblotting* podem ser utilizados (NEER et al.,

2002). Assim, um título de 1:80 ou maior deve ser considerado como uma infecção ou exposição, ou ambos (NEER e HARRUS, 2006).

No entanto, devido à infecção latente, uma titulação de anticorpos positiva não significa necessariamente que as manifestações clínicas são devidas à erliquiose, no momento da apresentação. Em áreas endêmicas, cães podem desenvolver títulos altos de IgG sem desenvolvimento de doença clínica causando um aumento de falso positivos nestas áreas (BULLA et al., 2004). Um número desconhecido de cães pode resolver espontaneamente a infecção por *Ehrlichia* spp. mas permanecem soropositivos. Além disso, podem ocorrer reações cruzadas entre outras espécies de *Ehrlichia* spp., *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *Neorickettsia* (WANER et al., 2001, NEER et al., 2002).

Títulos $\geq 1:40$ são considerados positivos para exposição por *E. canis*. Para infecções agudas, duas RIFIs consecutivas, 7-14 dias de intervalo, são recomendados, e um aumento em 4 vezes o título de anticorpos é sugestivo de infecção ativa. Anticorpos anti erliquiais persistem por vários meses a anos após o tratamento e eliminação da rickettsia (HARRUS e WANER, 2010).

Outra opção diagnóstica é o *western immunoblotting* que é tão sensível quanto a RIFI, mas tem a vantagem da objetividade da leitura, pois não sofre influência da subjetividade do operador, como ocorre na RIFI. Porém, é técnica cara, consome tempo e necessita de tecnologia mais avançada que a RIFI (ANDEREG e PASSOS, 1999).

Waner et al. (1995) realizaram estudo utilizando o ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) sanduíche ou de captura para o diagnóstico. O ELISA apresenta como vantagens alta sensibilidade e custo relativamente baixo. Essas qualidades fazem com que esse seja um ensaio amplamente empregado na detecção de antígenos e anticorpos, bem como, na quantificação de anticorpos produzidos em diversas doenças bacterianas, fúngicas e virais, humanas ou veterinárias (MADRUGA, ARAÚJO e SOARES, 2001).

O dot-ELISA é um ensaio de imunoabsorção enzimático desenvolvido em fase sólida. A principal vantagem desse tipo de teste é a rapidez na obtenção de resultados e sua simplicidade, não demandando equipamentos sofisticados na execução (MADRUGA, ARAÚJO e SOARES, 2001). O dot-blot ELISA foi comentado por Andereg e Passos (1999), sendo técnica sensível para detecção de anticorpos no soro, dispensando o emprego de equipamentos caros.

Kits comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina se baseiam no princípio do dot-blot-ELISA, como é o Immunocomb®-BIOGAL, e são capazes de determinar anticorpos IgG específicos para o parasito (ANDEREG e PASSOS, 1999). Testes rápidos de “dot-ELISA” que podem ser realizados na clínica veterinária (por exemplo, Snap 3DX e Dip-S-Ticks), são práticos, de baixo custo e tendem a tornarem-se exames de rotina para o diagnóstico de erliquiose (MORAIS et al., 2004).

O uso de proteínas recombinantes está sendo estudada. López et al. (2007) testaram um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) usando uma proteína recombinante P30 de *E. canis* e anticorpo monoclonal IgG anti cão ligado a peroxidase. Os resultados de sensibilidade e especificidade do teste foram de 77,5 e 95,54% respectivamente. Quando comparado à técnica de RIFI apresentou uma correlação de 0.8333. Desta forma, comparando os resultados matemáticos, o ELISA baseado no antígeno P30 é adequado ao diagnóstico da erliquiose canina.

Cárdenas et al. (2007) determinaram um ELISA para *E. canis* com 100% de especificidade e sensibilidade usando polipetídeos recombinantes gp36, gp19 e gp200. A gp36 e gp19 foram detectadas com 14 dias pós-infecção, sendo um método mais precoce comparada com a RIFI e reação cruzada com *E. chaffeensis* não foi detectada.

A PCR é efetiva na detecção de *E. canis* em tecidos e em monócitos sanguíneos (IQBAL e RIKIHISA, 1994) e tem sido usada com frequência no diagnóstico das erliquioses (KEYSARY et al., 1996; MURPHY et al., 1998, DAGNONE et al., 2003; AGUIRRE et al., 2004; MACHADO et al., 2006; AGUIAR, 2006).

Primers foram delineados baseados no alinhamento de 738 bp (pares de bases) da proteína formadora de pontes dissulfídricas do gene dsb de cinco *Ehrlichia* spp. alocadas no GenBank. Regiões identificadas dentro do gene são altamente conservadas entre as diferentes espécies. A sequência de ácidos nucléicos identificados entre os genes dsb erliquial variaram de 74,6 a 91,8%. Mas duas regiões altamente conservadas foram encontradas no alinhamento. O par de *primers* designados como Dsb-330 *forward* e Dsb-728 *reverse* amplificam um fragmento com 409 bp. (DOYLE et al., 2005b, LABRUNA et al., 2007).

O isolamento auxilia na caracterização do agente e obtenção de antígeno específico para determinada área geográfica, fundamental na realização de testes

sorológicos específicos. Mas é procedimento demorado e de elevado custo, sendo utilizado apenas para pesquisa. *E. canis* pode ser isolada e cultivada *in vitro* em células DH82, linhagem originária de monócitos caninos, que foi adaptada após um caso de histiocitoma (WELLMAN et al., 1988). O isolamento em cultura celular é uma técnica mais sensível e confiável, mas seu custo e tempo elevados dificultam o processo, devendo ser usado em casos realmente necessários (IQBAL, CHAICHANASIRIWITHAYA e RIKIHISA, 1994).

No Brasil, a *E. canis* foi isolada oito vezes com sucesso na linhagem de células DH82 provenientes do sangue de cães infectados. O primeiro isolamento foi no Rio de Janeiro (TORRES et al., 2002) e os outros foram em Jaboticabal (AGUIAR et al., 2007b), São Paulo (AGUIAR, HAGIWARA e LABRUNA, 2008) Cuiabá, Londrina, Monte Negro e Presidente Prudente (AGUIAR e ORLANDELI, 2009) e Uberlândia (ALVES, 2010).

III.VII. A ocorrência

A partir da primeira descrição da ocorrência da EMC na Argélia (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935), são inúmeros os relatos em todo o mundo: Brasil (LABARTHE et al., 2003), Cabo Verde (GÖTSCH et al., 2009), Camarões (NDIP et al., 2005), Espanha (AGUIRRE et al. 2004; SÁINZ et al., 1996), Estados Unidos (MURPHY et al., 1998; BOWMAN et al., 2009), Israel (BANETH et al., 1996; KEYSARY et al., 1996), Itália (COCCO et al., 2003), Japão (WATANABE et al., 2004), México (RODRIGUEZ-VIVAS, ALBORNOZ e BOLIO, 2005), Peru (VINASCO et al., 2007), Portugal (CARDOSO et al., 2010), Tunísia (M'GHIRBI et al., 2009), Taiwan (HUANG et al., 2010) e Venezuela (UNVER et al., 2001).

O primeiro relato no Brasil e América Latina ocorreu em Belo Horizonte, através da observação de mórula em linfócito de cão, chamando atenção dos clínicos e patologistas sobre a presença da infecção no Brasil (COSTA et al., 1973).

Nos últimos anos, vários estudos demonstram a ocorrência da doença no Brasil. Os métodos diagnósticos usados, as regiões e populações estudadas, cães urbanos e rurais, cães saudáveis e doentes, variam, mas independente destes fatores, a EMC ocorre, sendo realmente considerada importante enfermidade canina. Em uma revisão sobre a situação brasileira, Vieira et al. (2011) destacam que mesmo assim, em algumas regiões a situação da EMC é desconhecida.

A maioria dos estudos brasileiros relata a prevalência em cães atendidos em hospitais veterinários, então, casos suspeitos de EMC.

Labarthe et al. (2003), realizaram o maior inquérito sorológico brasileiro em cães com o uso do kit comercial de ELISA, SNAP 3Dx®. Foram colhidas 2553 amostras de soro de cães provenientes de clínicas veterinárias de 12 estados e encontraram 505 (19,8%) cães reagentes à *E. canis*.

Em estudo retrospectivo sobre a casuística clínica de erliquiose em cães atendidos entre março de 1998 e setembro de 2001 em Belo Horizonte/MG, foram analisadas 194 fichas clínicas de animais com suspeita de hemoparasitoses. Foram observados 31 cães com diagnóstico de *E. canis* e 21 com *Anaplasma platys*, por meio de exame parasitológico direto de esfregaços sanguíneos (MOREIRA et al., 2003). Diniz et al. (2007) avaliando amostras de sangue de 198 cães com alterações clínicas e patológicas consistentes com infecções transmitidas por carrapatos, e usando a PCR que é mais sensível, encontraram 154 (77,7%) positivos para *E. canis*. Entretanto, 125 cães tinham anticorpos contra *E. canis* e também eram positivos na PCR. Vinte e oito cães eram soronegativos e PCR positivos. Desta forma, não houve diferença estatística entre os resultados da PCR e RIFI.

A evidência de trombocitopenia é o principal achado clínico-patológico relacionado com a EMC na maioria dos casos. Oliveira et al. (2006) testaram em 70 amostras de sangue de cães que chegaram para hemograma no hospital veterinário em Viçosa, estado de Minas Gerais, quanto à presença de *E. canis* por *nested*-PCR. As taxas de infecção encontradas foram de 100% para cães com trombocitopenia apenas, 57,1% para cães com anemia e trombocitopenia, 29,4% para cães que não apresentavam anemia e trombocitopenia e de 26,3% para cães com anemia apenas. Dagnone et al. (2003), utilizando a PCR, diagnosticaram a erliquiose em 21% dos cães parasitados com carrapato, 20% dos cães com trombocitopenia e 21% dos cães anêmicos de Hospital Veterinário no Sul do Brasil.

Entretanto no Rio de Janeiro, Macieira et al. (2005) utilizaram também a PCR e observaram que 26,8% dos cães com trombocitopenia e 3,5% dos não trombocitopênicos eram positivos para *E. canis*. Desta forma, a identificação da erliquiose apenas pelos achados clínicos e laboratoriais como a presença de carrapatos, anemia e trombocitopenia não são conclusivas para o diagnóstico da EMC. Entre 221 cães avaliados, em Ribeirão Preto, 57/107 (53,3% dos trombocitopênicos e 29/114 (25,4%) dos não trombocitopênicos foram positivos para

infecção por *E. canis*. Considerando co-infecção com *Anaplasma platys* ou *Babesia* spp. com *E. canis*, o número de animais infectados aumenta para 85 (79,4%) entre os trombocitopênicos. Embora, estatisticamente, estes resultados indicam uma forte tendência ($P < 0.001$) este parâmetro não deve ser utilizado como diagnóstico para a doença, pois nos animais trombocitopênicos, outras agentes, como *A. platys* e *Babesia* spp., foram encontrados (SANTOS et al., 2009).

Estudos avaliando a prevalência nas populações caninas sadias são escassos. No município de Nova Cruzeiro/ Minas Gerais, 11 (15,07%) e 13 (17,81%) dos cães sadios eram reativos à RIFI para *E. chaffeensis* e *E. canis*, respectivamente (GALVÃO et al., 2002). Em áreas rurais de Minas Gerais foram encontrados, através de RIFI, 65,6% de cães reagentes para *E. canis* na região Nanuque, 37,8% em Belo Horizonte e 24,7% em Lavras (COSTA JR et al., 2007).

Na região norte do país, município de Monte Negro, Rondônia, através de RIFI, foram observadas mais reações positivas para *E. canis* em cães urbanos (37,0%) que em cães rurais (24,8%) (AGUIAR et al., 2007a). No sul do Rio Grande do Sul foram encontradas as mais baixas prevalências, 4,8% (SAITO et al., 2008), e na cidade de Cuiabá a mais elevada (42,5%) (SILVA et al., 2010).

No interior do Espírito Santo, 38 de 92 (41,3%) amostras de cães de área rural e cidade foram positivas (SPOLIDORIO et al., 2010). Em dois distritos de Salvador, Cajazeiras e Itapuã foram colhidas 472 amostras de cães, sendo 35,6% positivas na RFI e destas 34,5% foram positivas pela PCR para *E. canis* (SOUZA et al., 2010).

Felídeos também podem se infectar pela *E. canis*. No Brasil, há o relato clínico de um gato com sinais clínicos semelhantes à EMC que apresentava mórulas em leucócitos (ALMOSNY et al., 1998). Recentemente, Oliveira et al. (2009) amplificaram *E. canis* em três gatos domésticos de Viçosa. Em felídeos silvestres em cativeiro em zoológicos brasileiros, André et al. (2010) detectaram anticorpos e DNA de *E. canis*, esclarecendo que maiores estudos sobre a transmissão e se a doença se desenvolve nestes animais.

III.VI.I A ocorrência em Uberlândia/ MG

Em levantamento retrospectivo de cães com erliquiose/ babesiose atendidos no HOVET-UFU durante o ano de 2006, concluiu-se que a maioria dos cães eram

filhotes, com menos de um ano de vida, viviam em residências, seguidos daqueles que viviam em ruas e fazendas. Não encontraram diferença de incidência com relação a sexo e período do ano. A presença e, ou, histórico de contato com *R. sanguineus* correspondeu a 60% dos animais analisados. Os principais sinais clínicos da associação das doenças foram hipertermia, apatia, desidratação, palidez de mucosas, vômitos, anorexia, diarreia e aumento de sensibilidade renal à palpação (BARBOSA et al., 2006).

Avaliando esfregaços sanguíneos, Santos et al. (2004a) verificaram a frequência de hemoparasitoses em cães de Uberlândia. Em 2.373 hemogramas realizados, 372 foram positivos para hemoparasitoses, destes, 336 esfregaços (90, 32%), positivos para *Ehrlichia* spp., 8 (2,15%) positivos para *Babesia* spp. e 3 (0,8%) para *Hepatozoon* spp. Associação de parasitas foi encontrada entre *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. em 24 (6,45%) esfregaços.

Em sessenta (60) cães capturados em Uberlândia, estudou-se a presença de mórulas ou inclusões intracitoplásmicas em esfregaços de sangue periférico, corados por Giemsa. Os autores obtiveram 50% do animais positivos para *Ehrlichia* spp. isoladamente ou associada a outros hemoparasitas, como *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp. Constataram também que 100% dos animais apresentavam ectoparasitas, 45 (75%) possuíam *R. sanguineus* e 15 (25%) *Amblyomma cajennense*. A prevalência quanto ao sexo e à raça não foi significativa, mas com relação à idade, a positividade dependeu significativamente da faixa etária, e predominou nos animais de 5 a 10 anos (RIBEIRO et al., 2003).

Mendonça et al. (2005) avaliaram 109 hemogramas de cães com mórulas intraleucocitárias em extensões de sangue coletados de capilares marginais de pavilhão auricular. Encontraram com maior frequência anemia (77,98%), leucopenia (24,77%) e linfopenia (22,02%). Relataram que a anemia normocítica normocrômica e arregenerativa foi prevalente. Dos animais estudados, 3,67% apresentaram infecção concomitante com *Babesia* spp.

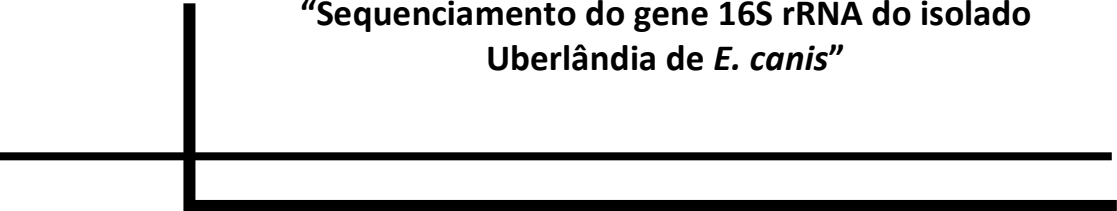
Borin et al. (2009) no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 avaliando 4407 cães atendido no HOVET-UFU, destes 203 (4,6%) cães, apresentaram mórulas e nenhuma outra doença concomitante. Este percentual se assemelha a dados que na fase aguda são encontradas aproximadamente 4% de mórulas nos esfregaços sanguíneos. A casuística dos casos manteve-se estável no período analisado. Foram encontradas mais mórulas em fêmeas 61,1% que em

machos 38,9%. Quanto a raça, 59% eram de raças definidas, sendo as mais freqüentes: Poodle (20%), pastor alemão (13%) e Pinscher (13%). A faixa etária de 1 até 23 meses apresentou maior freqüência 38% e 53% dos proprietários informaram que seus cães não tiveram contato com carrapatos.

Macedo (2007) realizou o primeiro estudo utilizando a PCR no diagnóstico da EMC em Uberlândia. A técnica foi usada para confirmar os esfregaços sanguíneos que apresentavam mórulas e ou inclusões citoplasmáticas em leucócitos, mostrando-se como um método menos subjetivo no diagnóstico. A partir dos *primers* utilizados, quatro amostras amplificaram apenas *Ehrlichia* spp., não sendo confirmado *E. canis*, sugerindo que possam ocorrer outras espécies de erliquíás na cidade.

Em 2010, foi obtido o isolado Uberlândia de *E. canis* por Alves, sendo a amostra proveniente de um cão Poodle atendido no HOVET-UFU e o isolamento realizado e mantido em células DH82.

**“Sequenciamento do gene 16S rRNA do isolado
Uberlândia de *E. canis*”**



Capítulo I

1. Introdução

A identificação e caracterização de espécies bacterianas e cepas são dependentes de suas características morfológicas e fenotípicas. Nos últimos anos, uma nova técnica para identificação e caracterização de espécies pelo seu código genético começou a ser utilizado com sucesso. Atualmente, o gene de DNA mais utilizado para caracterização de bactérias é o gene 16S rRNA, que é uma subunidade do gene 30S de ribossomas procarióticos, tendo uma extensão de 1.542 nucleotídeos (CLARRIDGE, 2004).

Assim, o sequenciamento do 16S rRNA se tornou uma alternativa rápida e precisa para identificação bacteriana. A utilização deste gene em estudos filogenéticos deve-se ao seu grau de conservação, podendo ser usado para marcar a evolução entre organismos. Seu grau de conservação é assumido pela sua importância como componente crítico da função celular. Mesmo assim, contém regiões hipervariáveis que podem fornecer as sequências espécie-específicas para identificação de bactérias (CLARRIDGE, 2004). No caso da *E. canis*, apresenta apenas uma sequência e separada dos genes 5S e 23S, o que difere de outras bactérias, onde os três genes formam um *operon* e possuem várias cópias. Esta característica incomum para outras bactérias é encontrada nos organismos rickettsiais (MAVROMATIS et al., 2006).

Através da atribuição de um valor numérico para as taxas de variação do gene, que podem variar durante a evolução, uma relação evolutiva entre os organismos pode ser determinada (CLARRIDGE, 2004).

No caso da *E. canis*, bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa e causadora de doença grave em cães e que tem uma ampla distribuição mundial devido a abundância do seu vetor, o carrapato *R. sanguineus*. *E. canis* também tem sido alvo de estudos nos últimos anos, tendo já sido depositados 109 sequenciamentos do 16S rRNA no GenBank. Dumler et al. (2001), em um trabalho ousado utilizando o 16S rRNA e outros genes, reorganizaram a ordem *Rickettsiales* em duas famílias: *Rickettsiaceae* e *Anaplasmataceae*, esta última, na qual está inserida a *E. canis*.

O genoma da *E. canis* também já está sequenciado, possuindo 1.315.030bp, com 984 genes identificados (MAVROMATIS, 2006).

Um exemplo da importância do sequenciamento do 16S rRNA é a caracterização da *Erlíquia Humana Venezuelana* (VHE) por Perez, Rikihisa e Wen (1996). O isolamento e sequenciamento a partir de sangue humano da VHE, mostrou-se mais próximo à *E. canis* Oklahoma que com *E. chaffeensis*. Logo depois, Unver et al. (2001) comprovaram que a cepa de *E. canis* VHE era idêntica à cepa de *E. canis* isolada de cães e carrapatos na mesma região geográfica, denominada *Erlíquia Canina Venezuela* (VDE), demonstrando que VHE e VDE, baseados no gene 16S rRNA, apresentavam alta similaridade (99,9%) com *E. canis* Oklahoma, além de perfis antigênicos semelhantes. A partir destes estudos, a preocupação zoonótica com *E. canis* foi aguçada, pela circulação do mesmo agente entre humanos, cães e carrapatos na Venezuela.

Alves (2010) isolou em cultivo celular uma *E. canis* a partir de uma amostra de sangue de um cão Poodle, macho, doente em Uberlândia/ MG. O sequenciamento do 16S rRNA confirmará a caracterização deste isolado.

2. Objetivos

2.1 Sequenciar o gene 16S rRNA do isolado Uberlândia de *E. canis*.

2.2 Comparar o isolado Uberlândia de *E. canis* com outros isolados do Brasil e do mundo.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reação em cadeia da polimerase

Amostra de DNA da cepa *E. canis* de Uberlândia, isolada em cultivo celular por Alves (2010), proveniente de um cão macho com cinco anos de idade da raça Poodle apresentando sinais clínicos de EMC, foi submetida ao seqüenciamento do gene 16S rRNA.

Para a amplificação do DNA foi utilizado *nested* PCR (MURPHY et al. ,1998), sendo como *outer* utilizados os *primers*: ECC (5'- AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C -3') e ECB (5'- CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A -3') e como *inner* os *primers*: ECAN5 (5' CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A 3') e HE3 (5' TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT 3') que amplificam fragmentos de 478 bp e 365 bp, respectivamente.

A reação foi composta de 100–200 ng de DNA; 25 pmol de cada *primer*; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega, Fitchburg, US); 2 mM MgCl₂; 1,25 U Platinum Taq Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, US); tampão da Taq contendo 50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL.

A *nested* PCR com partida a quente foi utilizada, na qual a enzima é adicionada após a desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C. A reação consiste em dois programas de ciclos que foram realizados no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Edison, US). No primeiro, utilizam-se os *outer primers* ECC e ECB com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final, uma extensão a 72°C por 5 minutos. Para o segundo ciclo, utiliza-se 5 µL do produto amplificado na primeira reação, em um novo mix contendo os *inner primers* ECAN5 e HE3. Para esta reação foi utilizada uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minutos. Em seguida, iniciam-se 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minutos. Ao final, uma extensão a 72°C por 5 minutos.

3.2 Purificação

Após a visualização do gel de agarose, as bandas da amplificação do gene 16S rRNA do isolado Uberlândia foram cortadas e purificadas com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, US) quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Montchanin, US), e estocado a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

3.3 Sequenciamento

Três amostras foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o Kit DYEnamic ET Dye Terminator (MegaBace, GE Healthcare, Piscataway, US), os primers ECAN5 e HE3 e utilizando o sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, US). Foram usados 30 ciclos para o sequenciamento, sendo a desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e a extensão de 60°C por 1 minuto.

3.4. Análises *in silico*

As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas utilizando o algoritmo CAP3 do Software BioEdit (HALL, 1999) e analisadas pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com a finalidade de procurar e comparar genes similares disponíveis no *GenBank*. O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizado pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

3.5. Números de acesso ao GenBank

As sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA utilizadas para comparação neste estudo estão disponíveis no *GenBank* com os seguintes números de acesso: *E. canis* isolado São Paulo, Brasil (DQ460714), *E. canis* cepa Brazil CO2 (EF195135), *E. canis* isolado VDE, Venezuela (AF373613), *E. canis* isolado VHE, Venezuela (AF73612), *E. canis* cepa Jake, Estados Unidos (CP000107), *E. canis*

cepa Madri, Espanha (AY394465), *E. canis* cepa Hd48, Cape Verde (GQ995381), *E. canis* cepa TWN, Taiwan (GU810149) e *Ehrlichia* spp. EH1087, Japão (AY309971).

4. Resultados

O seqüenciamento do gene 16S rRNA do isolado Uberlândia de *E. canis* resultou em um fragmento de 307 bp. Foi encontrada uma alta identidade entre a cepa Uberlândia de *E. canis*, com as demais disponíveis no GenBank. Na tabela 1 são apresentados os percentuais de identidade do isolado de Uberlândia, tendo de 97 a 100% de identidade, sendo a menor identidade com a cepa *Ehrlichia* spp. EH1087 do Japão que não tem caracterização da espécie e com as demais, apresentando 100%. Os resultados do seqüenciamento e alinhamento com cepas e isolados são mostrados na figura 1, onde somente a cepa japonesa apresentou substituições de nucleotídeos, um total de sete.

TABELA 1. Similaridade entre as seqüências parciais de nucleotídeos referentes ao gene 16S rRNA do isolado *E. canis* Uberlândia, 307 bp e diferentes cepas de *Ehrlichia* disponíveis.

Isolados e cepas ¹	Identidade com 16S rRNA	Número de nucleotídeos seqüenciados
<i>E. canis</i> isolado São Paulo	100%	339
<i>E. canis</i> cepa Brazil CO2	100%	1434
<i>E. canis</i> isolado VDE/ Venezuela	100%	1408
<i>E. canis</i> isolado VHE, Venezuela	100%	1408
<i>E. canis</i> cepa Jake	100%	1485
<i>E. canis</i> cepa Espanha	100%	1412
<i>E. canis</i> cepa Hd48/ Cape Verde	100%	575
<i>E. canis</i> cepa TWN	100%	1620
<i>Ehrlichia</i> spp. EH1087	97%	1412

¹ Números de acesso no *GenBank* estão disponíveis no Material e Métodos.

FIGURA 1. Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos do gene 16S rRNA de *E. canis*: Uberlândia, Brazil CO2, Japão, Taiwan, Cape Verde, VDE, Jake, Espanha, São Paulo e VHE. As bases nucleotídicas divergentes estão selecionadas. As seqüências foram extraídas do *GenBank* e alinhadas pelo programa computacional ClustalW.

Uberlandia	-----TGCCTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	36
BrazilCO2	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	139
Japan	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCTAT	137
Taiwan	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	237
CapeVerde	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	119
VDE	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	134
Jake	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	139
Spain	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	128
SaoPaulo	-----AATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	38
VHE	TGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCAT	134

Uberlandia	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	96
BrazilCO2	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	199
Japan	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	197
Taiwan	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	297
CapeVerde	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	179
VDE	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	194
Jake	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	199
Spain	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	188
SaoPaulo	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	98
VHE	TAGAAATGGTGGGTAAATACTGTATAATCCCCGAGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	194

Uberlandia	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	156
BrazilCO2	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	259
Japan	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	257
Taiwan	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	357
CapeVerde	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	239
VDE	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	254
Jake	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	259
Spain	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	248
SaoPaulo	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	158
VHE	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATCTATAGC	254

Uberlandia	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	216
BrazilCO2	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	319
Japan	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	317
Taiwan	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	417
CapeVerde	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	299
VDE	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	314
Jake	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	319
Spain	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	308
SaoPaulo	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	218
VHE	TGGTCTGAGAGGACGATCAGCCCACTGGAAGCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAG	314

Uberlandia	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	276
BrazilCO2	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	379
Japan	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	377
Taiwan	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	477
CapeVerde	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	359
VDE	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	374
Jake	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	379
Spain	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	368
SaoPaulo	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	278
VHE	GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTG	374

Uberlandia	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCA-----	307
BrazilCO2	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	439
Japan	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	437
Taiwan	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	537
CapeVerde	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	419
VDE	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	434
Jake	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	439
Spain	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	428
SaoPaulo	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	338
VHE	AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTTTCAATAGGGAAGATAATGACGGTACCTATAGA	434

5. Discussão

O 16S rRNA é usado na identificação bacteriana, por ser altamente conservado é usado em avaliações filogenéticas, sendo o gene amplamente utilizado na identificação da família *Anaplasmataceae* para amplificar erlíquias (DOYLE et al., 2005b) O sequenciamento deste gene caracteriza o isolado como *E. canis*. A alta homologia encontrada entre o isolado Uberlândia e diversas sequências de *E. canis* depositadas no GenBank confirma, que embora sendo de regiões distantes, este gene não sofreu modificações. Diferentes estudos apresentam 99,9 – 100% de similaridade entre diferentes isolados de *E. canis* da América do Sul (cepas VHE e VDE), América do Norte (cepa Oklahoma), Ásia (genótipos chineses e japoneses) e Oriente Médio (Israel e Turquia) (YU, McBRIDE e WALKER, 2007). Resultados semelhantes também foram obtidos por outros autores (PEREZ, RIKIHISA e WEN, 1996; UNVER et al., 2001; AGUIRRE et al., 2004; AGUIAR, HAGIWARA e LABRUNA, 2008).

O fato de possuir um vetor, o carrapato marrom e um hospedeiro, o cão doméstico, preferencial, determina uma conservação genética entre cepas. Outras espécies que se adaptaram a diferentes vetores e hospedeiros apresentam maior diversidade. A *E. canis* originou-se de um ancestral não muito distante e se dispersou pelo mundo acompanhando o cão (YU, McBRIDE e WALKER, 2007).

A cepa japonesa usada na análise provém de uma amostra de DNA do carrapato *Haemaphysalis* spp. e da qual não se estabeleceu espécie, portanto apresentando menor identidade.

Embora, a banda amplificada no nPCR possuir aproximadamente 365 bp, no sequenciamento foi possível identificar 307 nucleotídeos com alta qualidade. Este fragmento sequenciado do isolado, apesar de possuir 307 bp, não compromete sua homologia com outras sequências longas, pois sequências curtas podem fornecer informações suficientes para a comparação. Sendo, as sequências longas e completas necessárias na descrição de novas espécies (CLARRIDGE, 2004). A cepa de Taiwan usada na comparação, cujo sequenciamento é quase completo do 16S rRNA, não apresentou diversidade com outros isolados geograficamente diferentes do mundo (HUANG et al., 2010). Quando se deseja comparar cepas para propósitos epidemiológicos ou pesquisar fatores de virulência, o 16S rRNA não é o

mais adequado, pois são encontradas poucas variações e o gene também não codifica fatores de virulência (CLARRIDGE, 2004). Assim, outros genes relacionados a proteínas imunodominantes estão sendo usados na comparação entre cepas geograficamente diferentes. Para o isolado Uberlândia já foi descrito o resultado dos genes dsb e p28 (ALVES, 2010) sendo este último, uma proteína de superfície, que apresentou polimorfismos com outras *E. canis*, inclusive com a cepa São Paulo. Entretanto, o gene p28 se mantém conservado entre sete isolados americanos (McBRIDE, YU e WALKER, 1999) sugerindo seu uso no desenvolvimento de antígenos para diagnóstico e vacinas.

Estudos buscam variações moleculares e antigênicas entre cepas descritas pelo mundo. A gp36 e gp200 apresentaram maior diversidade gerando substituição de nucleotídeos resultando em dois aminoácidos diferentes (ZHANG et al., 2008). As sequências de repetições em *tandem* de cepas de *E. canis* norte americanas, brasileiras e camaronesas foram completamente conservadas para o gene gp36. Entretanto o número de repetições variou entre 4 e 18 cópias (DOYLE et al., 2005a). A gp200 sequenciada em Taiwan também foi geneticamente distinta de isolados americanos, brasileiros e israelenses, sugerindo inclusive que esta cepa possa ser uma nova cepa ainda não caracterizada (HUANG et al., 2010).

6. Conclusões

Assim, estudos sobre diversidades moleculares entre cepas são necessárias. Caracterização de novas cepas serve para o conhecimento da evolução e antigenicidade da *E. canis* no mundo. O sequenciamento do 16S rRNA do isolado Uberlândia de *E. canis* comprovou sua identificação, caracterização molecular e homologia com demais isolados descritos no GenBank.

**“Comparação antigênica de dois isolados brasileiros de
E. canis”**

Capítulo II

1. Introdução

A EMC, doença bacteriana que infecta cães através do carrapato marrom, tem ampla distribuição mundial: Estados Unidos (MURPHY et al., 1998), Israel (KEYSARY et al., 1996), Espanha (AGUIRRE et al., 2004), Portugal (CARDOSO et al., 2010), Cabo Verde (GÖTSCH et al., 2009), Venezuela (UNVER, 2001), Peru (VINASCO et al., 2007) e Brasil (AGUIAR et al., 2008).

O destaque mundial para a doença ocorreu durante a guerra do Vietnã, quando inúmeros cães do exército americano adoeceram da chamada na época Pancitopenia Tropical Canina. Os cães adoeciam agudamente, manifestando sangramentos (HILDEBRANDT et al., 1973). Atualmente, a manifestação clínica, por vezes é mais sutil e semelhante a outras infecções, fazendo pensar se ocorreu a resistência do hospedeiro ou redução da patogenicidade bacteriana.

Entretanto, variações na duração, severidade da manifestação da doença e alterações clinopatológicas podem ser atribuídas às variações patogênicas das cepas, resposta imunológica do hospedeiro, co-infecção com outra doença transmitida por carrapatos e outros fatores ainda desconhecidos (HEGARTY et al., 1997).

O diagnóstico dos cães acometidos torna-se difícil, pois os sintomas são comuns a outras doenças infecciosas que acometem cães, como apatia, anorexia, perda de peso e febre. Os sinais clínicos mais específicos são associados às alterações hematológicas como a trombocitopenia que se manifesta com sangramentos por orifícios naturais, mucosas e pele, anemia e leucopenia. Estes sinais só são identificados com exames complementares como o hemograma. Assim, os achados clínicos associados aos hematológicos são os recursos usados pelo clínico para identificar cães doentes e iniciar o tratamento. Para a confirmação do diagnóstico etiológico, as possibilidades são várias, mas pouco usadas na rotina clínica.

A RIFI é considerada como padrão ouro para o diagnóstico sorológico da EMC (HARRUS e WANER, 2010), sendo a técnica amplamente utilizada desde seu primeiro relato (RISTIC et al., 1972), mas apresenta várias limitações, enquanto outras técnicas mais eficazes no diagnóstico, como a PCR e *western immunoblot* não estão disponíveis. Podem ocorrer diversidades antigênicas entre amostras de *E.*

canis de diferentes regiões do mundo. A duração do processo infeccioso e diferenças entre as raças de cães quanto à resposta imune frente à EMC são outros fatores relacionados aos resultados esperados pela RIFI (WANER et al., 2001). Pela RIFI não há uma distinção entre infecção ativa de uma exposição sem o estabelecimento de infecção ou uma infecção prévia (IQBAL, CHAICHANASIRIWITHAYA e RIKIHISA, 1994). Outra limitação são as reações cruzadas com outros agentes do gênero (WANER et al., 2001, NEER et al., 2002, HARRUS E WANER, 2010). Rikihisa (1991) encontrou reações cruzadas quando imunizou cães com *Neorickettsia helminthoeca*, e testou com outros antígenos como *E. canis*, *N. risticii* e *N. sennetsu*. A resposta imune humoral dos antígenos em animais infectados ou imunizados varia. Assim cães infectados pela *N. helminthoeca* produziram anticorpos contra o grupo *Ehrlichia*. Mas, de forma oposta, cães infectados com *E. canis* produziram anticorpos espécie-específicos, com pouca reação com outros do grupo.

Reações cruzadas com outros agentes também são comentadas, como *Leishmania* spp. e *Babesia* spp. Utilizando soro de cães de município endêmico para erliquiose e babesiose (Jaboticabal) e de município endêmico para leishmaniose (Belo Horizonte) concluiu-se que as reações cruzadas entre *Leishmania* e *Ehrlichia* não ocorrem, mas sim a co-infecção dos agentes (OLIVEIRA et al. 2008).

Reações cruzadas com outras espécies da família *Anaplasmatacea* é um fator que pode confundir o diagnóstico da EMC pela RIFI. Como o Brasil é considerado endêmico para EMC e *A. platys* (SANTOS et al., 2009) e apenas existem indícios de *E. ewingii* e *E. chaffeensis* (MACHADO et al., 2006), a possibilidade de falsos positivos, são poucos.

Embora a EMC, há muito tempo já estudada e com ampla distribuição mundial, ainda não possui uma vacina efetiva e abrangente, o controle da doença é feito pelo controle do seu vetor o *R. sanguineus* e o tratamento de cães doentes.

Estudos de caracterização de cepas ajudam no entendimento da patogenicidade do agente ao seu hospedeiro e os meios com que consegue subverter seu sistema imune e sobreviver.

Por isso proteínas imunodominantes, como p28, gp19, gp36, gp140 e gp200, localizadas na superfície das erliquias estariam propensas a sofrerem variações e adaptações ao hospedeiro, e portanto são alvo de muitos estudos. A pouca diversidade encontrada nos genes que codificam estas proteínas nos isolados de *E.*

canis pode ser devido a pouca pressão seletiva que sofreram por se manterem quase que exclusivamente em um carrapato e hospedeiro preferenciais. Como a *E. canis* parece ser também bem conservada geneticamente em todo mundo (DOYLE et al., 2005a, YU, McBRIDE e WALKER, 2007), seria um fator favorável para o desenvolvimento de uma vacina e antígeno para diagnóstico e uso em todos os países.

Estudos comparando cepas e isolados brasileiros de *E. canis* são escassos. A partir da obtenção de novos isolados, a comparação com os já existentes e mantidos *in vitro* auxiliam no conhecimento das condições locais da permanência deste agente no Brasil.

2. Objetivo

Comparar a resposta de antígenos de RIFI produzidos a partir dos isolados São Paulo e Uberlândia de *E. canis*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção de amostras de soro de cães

Foram obtidas 48 amostras de soro de cães encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do HOVET-UFU, Uberlândia/Minas gerais e cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim. Estas amostras foram obtidas no mês de dezembro de 2009 e eram excedentes dos exames bioquímicos solicitados ao laboratório por inúmeras causas, inclusive cirúrgicas. Uberlândia está localizada na região sudeste, 18° 55' 7" S e 48° 16' 38" W, com uma altitude de 863m e área territorial total de 4.115,9 km² (EMBRAPA, 2010). A temperatura e precipitação média anual é de 22,3°C e 1.583,6mm, sendo o clima classificado como tropical de altitude com diminuição das chuvas no inverno (WIKIPÉDIA, 2010).

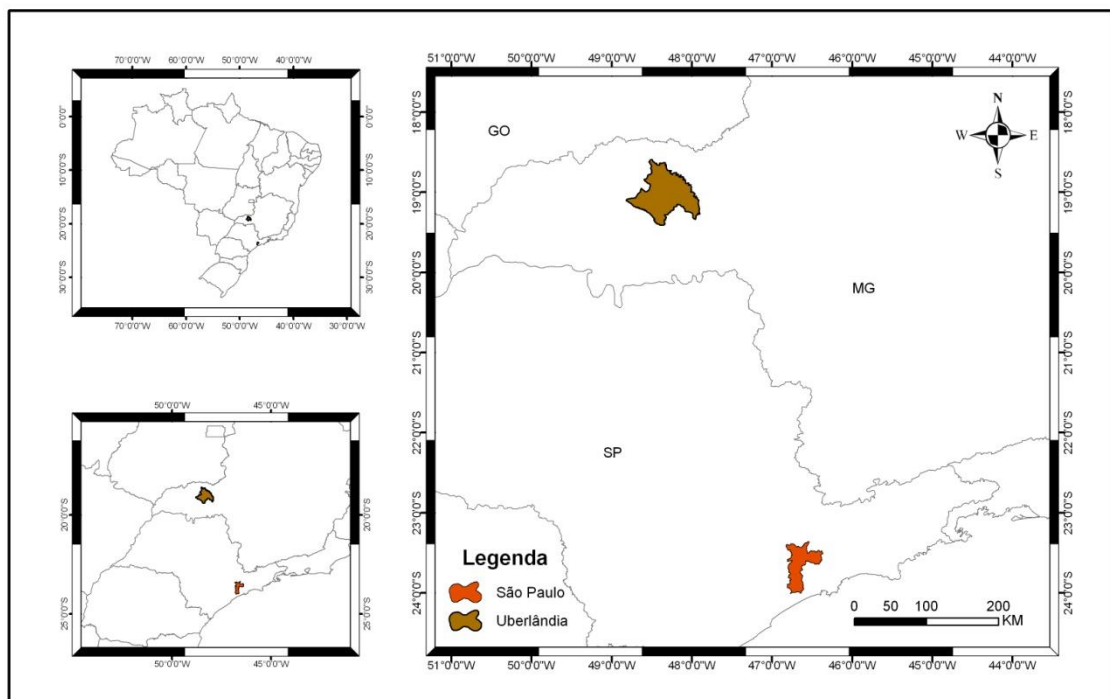
Sessenta amostras foram provenientes de uma soroteca de cães da Região do Grande ABC, sendo 29 soros de São Bernardo, 18 de Diadema e 13 de Santo André, e cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna. Estas amostras foram colhidas entre os dias 5 e 14 de abril de 2010. Tendo por referência a cidade de São Paulo, 23° 32' 51"S e 46° 38' 10" W, que também está localizada na Região Sudeste, mas no estado de São Paulo, é considerada uma metrópole que abriga as cidades acima citadas e outros 36 municípios denominando-se de Região Metropolitana de São Paulo com 19.672.582 habitantes, com um clima subtropical de temperatura média anual de 19,25°C e média pluviométrica de 1.376,2 mm (WIKIPÉDIA, 2010). A Figura 2 ilustra a localização de São Paulo e Uberlândia.

3. 2 Propagação de cepas de *E. canis*

Os isolados de *E. canis* São Paulo, cedidas pelo Dr. Marcelo Bahia Labruna da Universidade de São Paulo e Uberlândia (ALVES, 2010) foram propagadas em cultivo celular utilizando-se células de linhagem DH82 (ATCC nº CRL-10389). O cultivo foi mantido em garrafas de cultivo de 25 cm² (Techo Plastic Products, Transdingen, CH) com meio DMEM - Dulbeccos Modified Eagles Medium Low Glucose (LGC Biotecnologia, Cotia, BR) acrescido de 5% de soro de bezerro

(Hyclone, Utah, US), renovado parcialmente a cada 2-3 dias e mantido a 37°C e 5% de CO₂ (AGUIAR, 2006).

FIGURA 2: Localização cartográfica das cidades de São Paulo e Uberlândia no mapa do Brasil.



3.3 Confeção de lâminas para RIFI

Através do monitoramento de esfregaços da monocamada celular corados com Kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, BR) avaliava-se a taxa de infecção celular e quando apresentavam aproximadamente 80–95% de infecção a monocamada era raspada com cell scraper (Techo Plastic Products, Transdingen, CH), o conteúdo da garrafa centrifugado a 100g por 10 minutos e o sobrenadante descartado, o precipitado recuperado era diluído em aproximadamente 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) estéril (pH 7,2; 0,0084M Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄ e 0,147M NaCl) e realizada nova centrifugação para retirada do meio remanescente e o precipitado novamente diluído em PBS estéril. A suspensão de células era

contada em câmara de Neubauer e acertada para uma concentração de 10.000 células/mL.

Lâminas próprias para imunofluorescência (Perfectalab, São Paulo, BR) eram previamente submersas em acetona por 10 minutos, secas e em seguida limpas com álcool etílico absoluto.

Foram aplicados 10 µL da suspensão de células infectadas por poço nas lâminas e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 2 hs ou até que estivessem secas. Posteriormente, eram fixadas com acetona, identificadas, embaladas individualmente em papel alumínio e congeladas a -20°C.

3. 4 Reação de imunofluorescência indireta

As amostras de soro de cães de Uberlândia e São Paulo foram diluídas na razão dois de 1:40 até 1:81.920 em PBS acrescido de 1% soro albumina bovina (Sigma Aldrich, Saint Louis, US).

Soro controle negativo foi obtido de cão sadio sem contato com carrapatos, negativo na nPCR do gene 16S rRNA e o controle positivo, de um cão com quadro clínico de EMC confirmado pela presença de mórulas no esfregaço sanguíneo e nPCR do gene 16S rRNA.

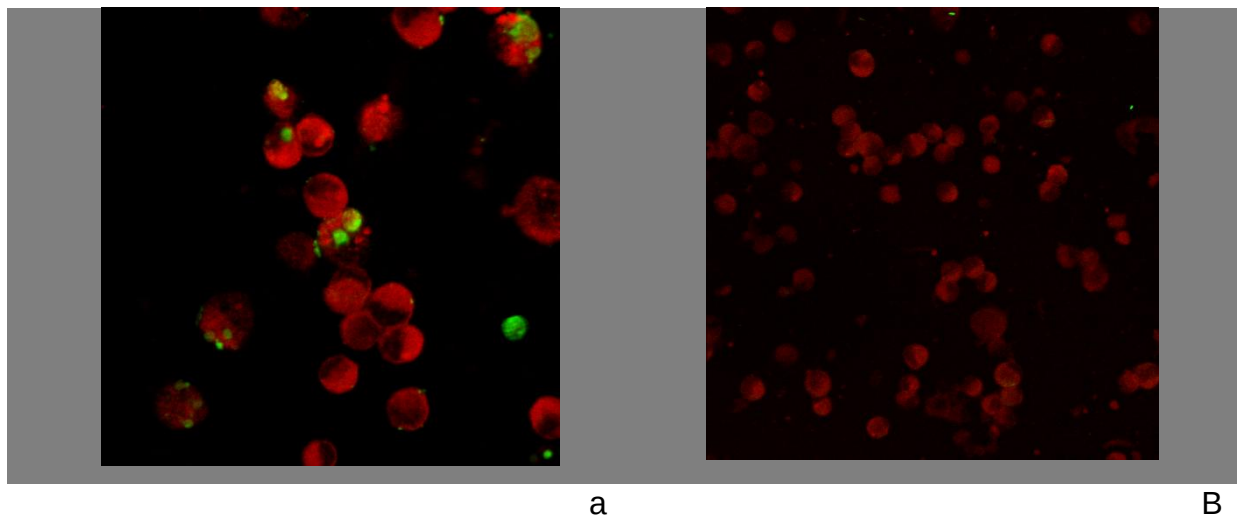
As reações foram realizadas simultaneamente com ambos antígenos. Desta forma, dez µL dos soros diluídos, controles positivo e negativo foram aplicados aos poços das lâminas próprias para RIFI, previamente preparadas, e incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após foram lavadas por cinco minutos duas vezes em PBS 7,2 e uma vez em água destilada. Após a secagem, foram incubadas com 10 µL de anticorpo secundário anti cão com fluoresceína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, US) diluído 1:400 em PBS e azul de Evans 1:1000 sob o abrigo da luz. As amostras foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C e em seguida lavadas como acima descrito, secas e montadas com glicerina tamponada pH 9 e lamínulas 40X60 mm (Perfectalab, São Paulo, BR) sob o abrigo da luz. A visualização foi realizada em microscópio fluorescente Axiovert 200M (Zeiss, Jena, GE) sendo o título final definido quando 50% das células apresentavam mórulas fluorescentes, na figura 2 são apresentadas uma reação positiva (a) e uma reação negativa (b).

3.5 Análise estatística

Foram calculadas a média e desvio padrão dos títulos finais das amostras positivas de São Paulo e Uberlândia, sendo realizado teste T pareado para comparação dos resultados obtidos do conjunto de amostras de São Paulo e Uberlândia frente a ambos os antígenos.

O coeficiente Kappa não ponderado foi calculado para avaliar a concordância entre antígenos de Uberlândia e São Paulo com amostras de soro de cães de Uberlândia e São Paulo. Por convenção foram usados os seguintes valores de *K*: >0=sem concordância, 0-0.19=pobre, 0.20-0.39=fraca, 0.40-0.59=moderada, 0.60-0.79=substancial, 0.80-1,00=concordância quase perfeita (LANDIS e KOCH, 1977).

FIGURA 3. Reação de imunofluorescência indireta para *E. canis*, usando antígeno bruto do isolado Uberlândia, sendo que quando a reação é positiva as mórulas apresentam fluorescência verde (a) e na reação negativa não há evidência da fluorescência (40x microscópio fluorescente Axiovert 200M).



4. Resultados

Foram comparadas 48 amostras de soro de cães de Uberlândia e 60 amostras de São Paulo com os antígenos de *E. canis* de Uberlândia e São Paulo. Todas as 75 amostras negativas, 24 (50%) de Uberlândia e 51(75%) de São Paulo, foram negativas para ambos os antígenos. Entre as amostras positivas, 24 (50%) de Uberlândia e 9 (15%) de São Paulo, tiveram variação no título final. Dezenove soros positivos tiveram titulação final maior quando testados com antígeno local e apenas dois tiveram sua titulação final menor com seu antígeno local (TABELA 2).

A média e o desvio padrão do título final das amostras positivas para os antígenos testados mostram significância apenas com amostras de Uberlândia (TABELA 3)

Quando utilizado o teste Kappa (TABELA 4), e, avaliado apenas o resultado como positivo ou negativo, independente da diluição, não existe diferença entre os resultados do tipo de antígeno e da origem do soro, apresentando uma concordância perfeita ($K=1,0$). Já quando avaliadas as titulações finais, utilizando-se somente os soros de São Paulo e os dois antígenos, houve uma concordância fraca ($K=0,2602$), e quando foi utilizado somente os soros de Uberlândia ocorreu uma pobre concordância ($K=0,0247$), assim como, quando avaliadas juntas as amostras de soro de São Paulo e Uberlândia ($K=0,1274$).

TABELA 2. Resultados dos títulos finais das amostras positivas para RIFI usando antígeno de dois isolados de *E. canis*, São Paulo e Uberlândia.

Amostras	Título final da cepa São Paulo de <i>E. canis</i>	Título final da cepa Uberlândia de <i>E. canis</i>
Udi 1	1:5120	1:5120
Udi 6 #	1:640	1:2560
Udi 8	1:1280	1:1280
Udi 10 #	1:640	1:1280
Udi 11 #	1:20480	1:40960
Udi 16 #	1:10240	1:20480
Udi 20 #	1:640	1:5120
Udi 24 #	1:10240	1:81920
Udi 25 #	1:80	1:160
Udi 28 #	1:1280	1:10240
Udi 35	1:10240	1:10240
Udi 36	1:20480	1:20480
Udi 43	1:40960	1:40960
Udi 45 #	1:320	1:640
Udi 49 #	1:640	1:1280
Udi 52	1:20480	1:20480
Udi 52	1:10240	1:10240
Udi 54	1:20480	1:20480
Udi 56 #	1:10240	1:40960
Udi 58 #	1:5120	1:10240
Udi 59 #	1:2560	1:5120
Udi 60	1:10240	1:10240
Udi 61 #	1:20480	1:40960
Udi 62 #	1:20480	1:81920
Um 15 #	1:80	1:40
Um 25 #	1:320	1:40
Zo 04	1:1280	1:1280
Zo 09 #	1:81920	1:40960
Zo 16 *	1:2560	1:5120
Zo 17 *	1:5120	1:10240
Hr 07 #	1:10240	1:5120
Hr 12	1:320	1:320
Hr 17	1:320	1:320

RIFI, reação de imunofluorescência indireta; Udi, amostra positiva de soro de cão de Uberlândia; Um, amostra positiva de soro de cão do bairro Umbanda, São Bernardo do Campo; Zo, amostra positiva de soro de cão do bairro Zoológico, Diadema; Hr, amostra de soro positiva de cão do bairro Horto Florestal, Santo André; #, amostra de soro local com título final maior; *, amostra de soro local com título final menor.

TABELA 3. Média e desvio padrão dos títulos finais das amostras positivas para RIFI usando antígeno de dois isolados de *E. canis*, São Paulo e Uberlândia.

Origem das amostras	Antígeno São Paulo	Antígeno Uberlândia	P -value
São Paulo	11.351,11±26.671,23	7.048,89±13.179,88	0,3839
Uberlândia	10.150,00±10.246,77a	20.140,00±23.489,45b	0,0183

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa.

TABELA 4. Valores do índice *Kappa* não ponderado para as avaliações pela reação de imunofluorescência indireta de acordo com a origem das amostras.

Resultado positivo e negativo de todas as amostras	Titulação final das amostras São Paulo	Titulação final das amostras Uberlândia	Titulação final de todas as amostras
1,000	0,2602	0,0247	0,1274

5. Discussão

Diversidades antigênicas entre cepas de várias regiões do mundo são sugeridas (HEGARTY et al., 1997). O Brasil, um país com dimensões continentais onde predominam temperaturas tropicais e com a disseminação do *R. sanguineus*, existem relatos da ocorrência da EMC em todas as suas regiões: sul (DAGNONE et al., 2003), sudeste (OLIVEIRA et al., 2000), centro oeste (SILVA et al., 2010), nordeste (RAMOS et al., 2010) e norte (AGUIAR et al., 2008a). No Brasil foram descritos oito isolados de *E. canis*, Rio de Janeiro (TORRES et al., 2002), Jaboticabal (AGUIAR et al., 2007b), São Paulo (AGUIAR, HAGIWARA e LABRUNA, 2008), Cuiabá, Londrina, Monte Negro e Presidente Prudente (AGUIAR e ORLANDELI, 2010) e Uberlândia (ALVES, 2010), mas apenas Aguiar e Orlandeli (2010) compararam antígenos com soros heterólogos.

Estudos sobre cepas visam avaliar se o agente sofreu mudanças que possam alterar sua patogenicidade e antigenicidade. Desta forma, utilizando dois isolados São Paulo e Uberlândia, os quais já foram parcialmente caracterizados pelos genes *dsb* e *p28*, verificou-se que a resposta antigênica é semelhante frente às amostras de soros de cães que adquiriram a infecção natural em duas diferentes regiões.

As amostras de soro de cães de Uberlândia, provenientes da casuística do HOVET-UFU, apresentaram um percentual elevado de positividade (50%) concordando com outros estudos que colocam a EMC como principal doença infecciosa da população canina de Uberlândia (BARBOSA et al., 2006). Percentuais elevados de cães positivos para EMC atendidos em hospitais veterinários brasileiros já foram relatados: 92% em Jaboticabal (OLIVEIRA et al., 2000), 40% em Botucatu (UENO et al., 2009) e 38% em Recife (RAMOS et al., 2010). Quinze por cento das amostras paulistanas foram positivas e referem-se a animais sadios da grande São Paulo, cujas amostras foram colhidas para estudo de outros agentes.

O título final médio foi elevado, com desvio padrão também elevado, pois houve uma grande variação entre 1:40 e 1:81.920. Cães infectados pela *E. canis* apresentam elevados títulos, mesmo após a eliminação do parasita e estes títulos podem permanecer por períodos prolongados como dois anos (IQBAL e RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998). Cães experimentalmente infectados apresentaram título final superior a 10.240 sem apresentarem manifestação clínica da doença

(AGUIAR et al., 2007b). Então o título final elevado não significa necessariamente que o cão está doente.

Estas variações nos títulos talvez sejam em virtude das suas variações antigênicas e especificidades. Keysary et al. (1996) encontraram altos títulos de anticorpos usando o antígeno local, Israel, quando comparado com o antígeno da Flórida. A explicação seriam as diferenças antigênicas sutis entre as cepas, com maior especificidade para a cepa local. Resultados semelhantes foram observados com antígeno de RIFI para a cepa local de Madri, onde diferenças entre o número de amostras positivas e título de anticorpos foi maior que com antígenos da cepa de Oklahoma e antígeno comercial (AGUIRRE et al., 2009).

Estas particularidades antigênicas na variação do título final também foram descritas no Brasil. Comparando os antígenos de RIFI com cepas de Jaboticabal e Oklahoma com soros de cães de Jaboticabal, os resultados em 10 soros positivos e 20 negativos foram concordantes, mas todos os títulos finais com o antígeno Jaboticabal foram maiores. As mesmas amostras testadas com ELISA comercial (SNAP 3DX®) apresentaram baixa sensibilidade, pois duas amostras apresentaram-se negativas, quando comparadas com os resultados da RIFI (AGUIAR et al., 2007b). Utilizando antígeno na RIFI com cinco isolados: São Paulo, Cuiabá, Presidente Prudente, Londrina e Monte Negro, foram encontradas diferenças nos títulos finais quando testados com soros de outras regiões (AGUIAR e ORLANDELLI, 2009).

Pelo índice *Kappa*, considerando somente a reação com a mínima diluição, detectando apenas positivos ou negativos, não houve diferença entre os resultados, independente do tipo de antígeno (São Paulo/Uberlândia) e da origem do soro (São Paulo/Uberlândia). Portanto, a diferença antigênica demonstrada em estudos *in sílica* (ALVES, 2010) não é suficiente para que ocorram falsos negativos ou positivos. No entanto, quando se avaliou a titulação final, os soros de São Paulo tiveram um índice kappa fraco e os de Uberlândia tiveram um índice pobre. Isso demonstra que os dois antígenos possuem respostas diferentes, sendo que os animais de São Paulo, que provavelmente adquiriram anticorpos contra a cepa isolada daquela região, não respondem de forma “tão diferente” às erlíquias de Uberlândia. Já os animais que entraram em contato com o antígeno de Uberlândia produzem anticorpos com afinidade maior para o antígeno Uberlândia.

Estudos recentes utilizam a comparação molecular, avaliando o grau de homologia dos genes e antigênica pelo potencial na produção de anticorpos, entre cepas. Comparando gp19, gp36, gp140 e gp200 pelo *immunoblot*, cepas do Brasil e Estados Unidos, exibiram um perfil altamente conservado entre proteínas imunoreativas. Ao mesmo tempo, algumas diferenças foram encontradas entre duas cepas israelenses no gene da gp36, caracterizando que em Israel podem existir duas cepas diferentes (ZHANG et al., 2008). Entre os genes atualmente avaliados o gp 36 é o único que pode diferenciar isolados, e nos estudos de Doyle et al. (2005b) os genótipos do Brasil e Camarões foram os mais divergentes com uma homologia de 97,2%.

O gene p28 e a sua proteína presente na membrana externa da erliquia, que serve como adesina (OHASHI et al., 1998), que foi detectada *in vitro* (MCBRIDE, YU e WALKER, 1999) e expressas no hospedeiro (RIKIHISA, EWING e FOX, 1994), apresenta características promissoras para uso como antígeno de diagnóstico e vacina. O percentual de homologia do gene p28 do isolado Uberlândia com Jaboticabal e a cepa VHE da Venezuela foi de 98%, com o isolado São Paulo foi de 97% e 96% com Jake e Oklahoma que são cepas americanas. O índice antigênico identificou determinantes antigênicos potenciais nestas cepas, onde similaridades foram encontradas, mas pelas diferenças encontradas em alguns epítomos sugerem que as proteínas traduzidas pelo p28 são diferentes entre os isolados, independente da origem (ALVES, 2010). Neste caso, as cepas brasileiras de Uberlândia e Jaboticabal são mais próximas quando comparadas com São Paulo. Mesmo sendo o antígeno de RIFI bruto, o qual pode expressar inúmeras proteínas imunoreativas, a observação da variação antigênica do gene p28 e os resultados da RIFI aqui apresentados, concordam que existem pequenas diversidades entre as cepas estudadas.

6. Conclusões

Os antígenos provenientes de São Paulo e Uberlândia (duas cidades do sudeste Brasileiro, mas com características geográficas diferentes e distantes aproximadamente 600 km) podem ser usados na identificação de anticorpos para *E. canis*, pois ambos os antígenos, respeitando suas especificidades, conseguem identificar animais positivos e negativos. No entanto, a titulação final deve ser utilizada com restrições para qualquer que seja sua finalidade

**“Estudo epidemiológico da prevalência de anticorpos de
E. canis na população canina de Uberlândia, Minas
Gerais”**

Capítulo III

1. Introdução

A EMC, doença bacteriana causada pela bactéria intracelular obrigatória gram negativa *E. canis*, que necessita de um vetor, no caso o *R. sanguineus*, para que ocorra a transmissão natural entre cães, há muito tempo é descrita como uma das principais doenças canina no Brasil. Seu primeiro relato foi em 1973, por Costa et al., que a encontraram em esfregaços sanguíneos de cães suspeitos. O Brasil tendo um clima predominantemente tropical e subtropical, esta bactéria encontrou condições climáticas ideais para se propagar.

No diagnóstico sorológico da EMC a RIFI é considerada padrão ouro (HARRUS e WANER, 2010) desde seu primeiro relato por Ristic et al. (1972) e sendo amplamente utilizada em estudos epidemiológicos no mundo (SÁINZ et al., 1996; MURPHY et al., 1998; NDIP et al., 2005) e no Brasil (GALVÃO et al., 2002; COSTA JR et al., 2007; AGUIAR et al., 2007a; DINIZ et al., 2007; ORIÁ et al., 2008; SAITO et al., 2008; SOUZA et al., 2010; SILVA et al. 2010).

As restrições do uso da RIFI são suas reações cruzadas com outros agentes da família *Anaplasmataceae* (RIKIHISA, 1991, WANER et al., 2001, NEER et al., 2002; HARRUS E WANER, 2010). Embora no Brasil, pouco se sabe sobre a real ocorrência de reações cruzadas, assim torna-se difícil discorrer sobre este tema. A reação cruzada com *Leishmania* foi descartada com o estudo de Oliveira et al. (2008) utilizando amostras de áreas endêmicas e livres. Relatos sobre outras erliquias existentes são escassos, como *E. chafeensis* (GALVÃO et al., 2002, LABRUNA et al., 2007) e *E. ewingii* (OLIVEIRA et al., 2009). A infecção pelo *A. platys* no Brasil ocorre, mas também sua co-infecção com *E. canis* (SANTOS et al. 2009).

A detecção inicial de IgG parece estar dependente da quantidade de inóculo ao qual o cão foi exposto (WANER et al., 2001). Cães podem permanecer com altos títulos de IgG por um longo período, mesmo após a eliminação do parasita (IQBAL e RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998).

Recentemente, uma revisão, abordou a erliquiose no Brasil (VIEIRA et al., 2011), relacionando estudos em todas as regiões brasileiras. Estas pesquisas utilizaram diferentes métodos investigativos e populações, tanto cães doentes como saudáveis. Mesmo assim, em muitos estados e territórios a situação da erliquiose é

desconhecida como em Goiás, Tocantins, Sergipe, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Maranhão, Pará, Amazonas, Amapá, Roraima e Acre.

As prevalências da EMC a partir das frequências encontradas em clínicas e hospitais veterinários foram muito abordadas (OLIVEIRA et al., 2000, DINIZ et al. 2007, SANTOS et al., 2009, UENO et al. 2009). Em Uberlândia, Borin et al. (2009), no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003, avaliaram atendimentos de 4407 cães no HOVET, destes 203 cães (4,6%), foram selecionados, por apresentarem mórulas e nenhuma outro hemoparasita concomitante, para estudo da casuística. Este percentual se assemelha os dados de que na fase aguda são encontradas aproximadamente 1 a 5% de mórulas nos esfregaços sanguíneos (RODRIGUEZ-VIVAS, ALBORNOZ e BOLIO, 2005). Os casos mantiveram-se estáveis no período analisado. Foram encontradas mais mórulas em fêmeas 61,1% que em machos 38,9%. Quanto à raça, 59% dos casos de EMC eram de raças definidas, sendo as mais frequentes: Poodle (20%), pastor alemão (13%) e Pinscher (13%). A faixa etária até 23 meses apresentou maior frequência, 38%, e, 53% dos proprietários informaram que seus cães não tiveram contato com carrapatos. Nos relatos de Santos et al. (2004) em Uberlândia, avaliando o esfregaço sanguíneo, houve uma frequência maior da EMC. Dentre os 2373 hemogramas avaliados, 372 (15,6%) foram positivos para hemoparasitas, sendo 336 (14,1%) para *Ehrlichia* spp. e foram observadas também coinfeções com *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp.

Em um hospital veterinário de Botucatu, usando a PCR foram encontrados 77,7% de positivos entre cães suspeitos (DINIZ et al., 2007). Se o objetivo é verificar se o cão está doente, a PCR pode ser melhor alternativa, pois se há parasitemia, poderá ser detectada pela PCR com maior sensibilidade que na observação da mórula no esfregaço sanguíneo. No entanto, quando são comparados métodos indiretos e diretos na detecção da *E. canis*, a proporção de animais sorologicamente positivos é maior. Amostras com sorologia positiva e PCR negativo pode ser uma indicação do status de portador ou animal tratado, porque cães com anticorpos anti-erliquia podem não estar infectados. Os resultados negativos na PCR também são explicados pela capacidade do parasita esconder-se nos macrófagos do baço (HARRUS et al., 1998). Animais infectados e sadios podem servir como reservatórios da doença, entretanto é incerto, como e quando, o cão na fase subclínica irá progredir para a fase crônica (NEER e HARRUS, 2006).

Entretanto, para ensaio epidemiológico, a verificação da exposição ao agente pela procura de anticorpos específicos, é alternativa confiável. Poucos estudos no Brasil utilizaram apenas amostras de animais sadios e a RIFI como metodologia (GALVÃO et al., 2002; COSTA JR et al., 2007; AGUIAR et al., 2007a; SAITO et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Em Uberlândia, uma cidade em intenso desenvolvimento, os estudos envolvendo a ocorrência da *E. canis* não descrevem sua real abrangência na populações canina, sendo assim necessário uma avaliação ampla em todas regiões do município.

2. Objetivos:

2.1 Objetivo geral

Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp na população canina de Uberlândia/ Minas Gerais

2.2 Objetivos específicos

Verificar o percentual de cães sororreativos para *Ehrlichia* spp.

Verificar se fatores como sexo, idade, raça, dono, localização e contato com carrapatos influenciam na ocorrência de anticorpos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção das amostras de soro de cães

Para a determinação da amostra populacional de cães a ser estudada foi utilizada estatística descritiva, e usados como referencial a população de Uberlândia de 634.349 habitantes (DATASUS, 2010) e considerando que a população canina, represente 13,5% dos habitantes (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2010). Desta forma, estima-se que a cidade possua 85.637 cães. Portanto para uma prevalência da EMC de 50% e com intervalo de confiança de 95%, o número de amostras colhidas deveria ser de no mínimo 382.

Para o levantamento epidemiológico foram colhidas 400 amostras de sangue de cães saudáveis da área urbana e rural de Uberlândia, mediante autorização dos proprietários e chefia do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). As amostras foram colhidas no período de 03 de maio a 27 de agosto de 2010 no CCZ, residências e fazendas do município. As amostras colhidas com o auxílio da equipe do CCZ foram dos cães errantes provenientes da captura e de cães doados e entregues no CCZ. Durante a campanha de vacinação anti-rábica foram acompanhados alguns postos de vacinação e com o consentimento dos proprietários, as amostras eram colhidas. As demais amostras foram colhidas em residências urbanas e rurais do município com o consentimento dos proprietários. Em anexo está o modelo do termo de autorização da coleta de amostra de sangue.

Os cães eram contidos pelos proprietários ou voluntários e após prévia desinfecção da pele e pêlos era realizada a punção da veia cefálica com agulha para coleta de sangue a vácuo 21G'' (Labor Importação Exportação, Osasco, BR) e utilização de tubos a vácuo (Terumo, Leven, BE). As amostras eram mantidas refrigeradas até a chegada ao laboratório para centrifugação a 100g por 10 min, separação do soro e estoque em freezer -20°C.

3.2 Propagação de cepas de *E. canis*

O isolado de *E. canis* São Paulo, cedidas pelo Dr. Marcelo Bahia Labruna, Universidade de São Paulo foi propagado em cultivo celular utilizando-se células de linhagem DH82 (ATCC n^o: CRL-10389). O cultivo foi mantido em garrafas de cultivo de 25 cm³ (Techo Plastic Products, Transdingen, CH) com meio DMEM - Dulbeccos Modified Eagles Medium Low Glucose (LGC Biotecnologia, Cotia, BR) acrescido de 5% de soro de bezerro (Hyclone, Utah, US), renovado parcialmente a cada 2-3 dias e mantido a 37°C e 5% de CO₂ (AGUIAR, 2006).

3.3 Confeção de lâminas para RIFI

Através do monitoramento de esfregaços da monocamada celular corados com Kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, BR) avaliava-se a taxa de infecção celular e quando apresentava aproximadamente 80–95% de infecção a monocamada era raspada com *cell scraper* (Techo Plastic Products, Transdingen, CH), o conteúdo da garrafa centrifugado a 100g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado recuperado era diluído em aproximadamente 5 mL PBS estéril pH 7,2 e realizada nova centrifugação para retirada do meio remanescente e o precipitado novamente diluído em PBS estéril. A suspensão de células era contada em câmara de Neubauer e acertada para uma concentração de 10.000 células/ mL.

Lâminas próprias para Imunofluorescência (Perfectalab, São Paulo, BR) eram previamente submersas em acetona por 10 minutos, secas e em seguida limpas com álcool etílico absoluto.

Foram aplicados 10 µL da suspensão de células infectadas por poço nas lâminas e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 2 hs ou até que estivessem secas. Após eram fixadas com acetona, identificadas, embaladas individualmente em papel alumínio e congeladas a -20°C.

3. 4 Reação de imunofluorescência indireta

As amostras de soro de cães de Uberlândia foram diluídas 1:80 em PBS acrescido de 1% soro albumina bovina (Sigma Aldrich, Saint Louis, US).

Soro controle negativo foi obtido de cão sadio sem contato com carrapatos e negativo na nPCR do gene 16S rRNA e o controle positivo, de um cão com quadro clínico de EMC confirmado pela presença de mórulas no esfregaço sanguíneo e nPCR do gene 16S rRNA.

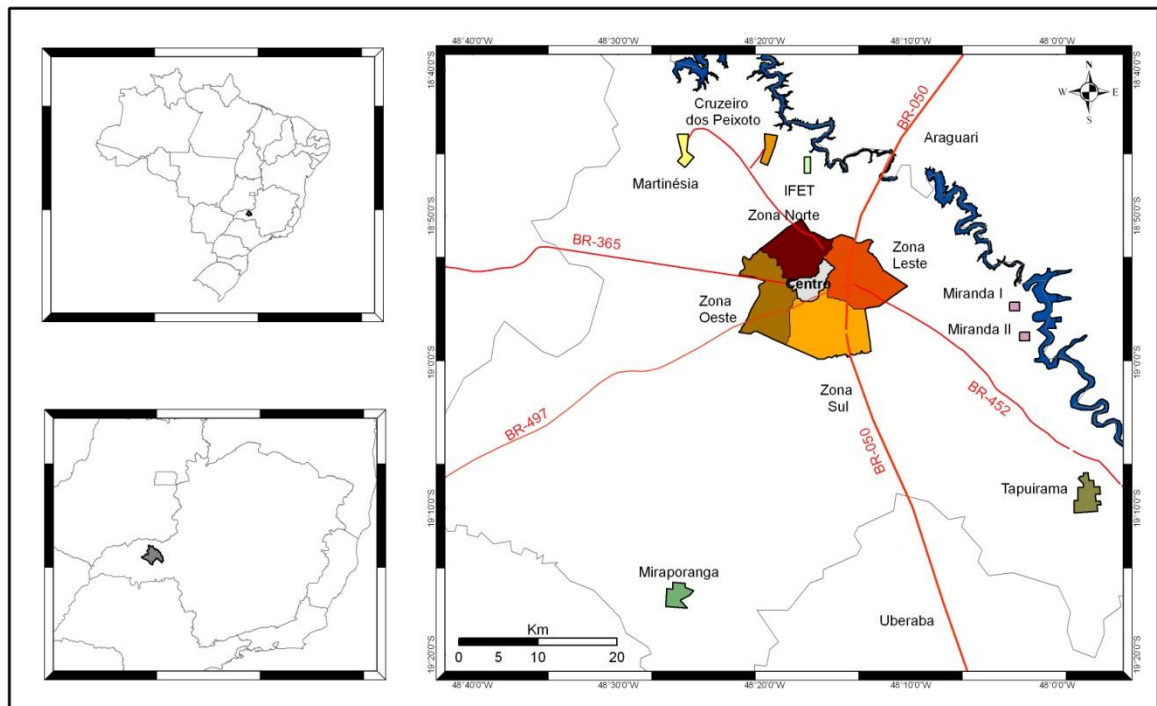
Desta forma, dez μL das amostras de soros diluídos na razão 1:80, controles positivo e negativo foram aplicados aos poços das lâminas próprias para RIFI, previamente preparadas e incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C . Após foram lavadas por cinco minutos duas vezes em PBS 7,2 e uma vez em água destilada. Após a secagem, foram incubadas com 10 μL anticorpo secundário anti cão conjugado com fluoresceína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, US) diluído 1:400 em PBS e azul de Evans 1:1000 sob o abrigo da luz. As amostras foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C e em seguida lavadas como acima descrito, secas e montadas com glicerina tamponada pH 9 e lamínulas 40X60 mm (Perfectalab, São Paulo, BR) sob o abrigo da luz. A visualização foi realizada em microscópio fluorescente Axiovert 200M (Zeiss, Jena, GE) sendo o resultado considerado positivo quando no mínimo 50% das células apresentavam mórulas fluorescentes e negativas pela ausência de fluorescência.

3.5 Análise estatística

Na coleta das amostras dos cães foram observadas variáveis qualitativas de sexo (masculino e feminino), idade (jovens até um ano e adultos com mais de um ano de idade) e raça. Os cães do CCZ eram classificados em errantes os provenientes da captura de cães soltos nas ruas e doados que eram entregues para doação, as demais amostras foram obtidas de cães com dono durante a campanha de vacinação anti-rábica 2010 e em residências uberlandenses. Os proprietários dos cães permitiram a coleta conforme modelo de autorização em anexo. O contato ou não com carrapatos também foi investigado junto aos proprietários. A origem domiciliar dos animais foi classificada em área urbana e rural. Na área urbana, Uberlândia é dividida em cinco setores: centro, norte, sul, leste e oeste; e possui quatro distritos: Cruzeiro dos Peixotos, Martinésia, Miraporanga e Tapuira, os quais formaram a variável distritos. A coleta de amostras na área rural concentrou-se em locais próximos as principais rodovias que atravessam o município: BR 452 em direção ao município de Araxá, BR 050 em direção ao município de Uberaba, BR

050 em direção ao município de Araguari, BR 497 em direção ao município de Prata, BR 365 em direção ao município de Ituiutaba, nas áreas da represa: Miranda I e II, e na fazenda Sobradinho sede do Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFET) – Campus Uberlândia. Na Figura 4 estão representadas informações cartográficas sobre Uberlândia, MG.

Figura 4. Representação cartográfica do município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.



Para avaliar a associação do resultado positivo ou negativo da RIFI para a *E. canis* e as variáveis qualitativas foi utilizado do teste de Qui Quadrado (Viera, 2004), considerando uma significância estatística $p < 0,05$. Quando as frequências esperadas foram menores que 5 a significância do teste do qui-quadrado foi obtida por meio da simulação pelo Método de Monte Carlo com 10.000 reamostragens. O software SPSS versão 17.0 para Windows (SPSS, Chicago, US) foi utilizado na análise.

3.6 Aprovação pelo comitê de ética

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais sob o número 108/10 em 06 de julho de 2010 (em anexo).

4. Resultados

Entre os cães amostrados em Uberlândia/MG foram obtidos 211 (52,8%) positivos e 189 (47,3%) negativos na RIFI para *Ehrlichia* spp. (FIGURA 5). Observou-se uma tendência do gênero masculino ser mais reativo que o feminino (TABELA 5). No entanto, a idade influenciou no resultado da RIFI, cães adultos, acima de um ano de idade, foram mais reativos que os e jovens, menos de um ano ($p=0,002$) (TABELA 6). O fator raça não foi avaliado, pois algumas das raças foram representadas apenas por um animal e a grande maioria das amostras, 265, era de cães sem raça definida e apenas 135 apresentavam definição racial, onde 25 raças diferentes foram observadas (FIGURA 6).

FIGURA 5: Relação entre número e percentual de cães positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, Uberlândia/MG, 2010.

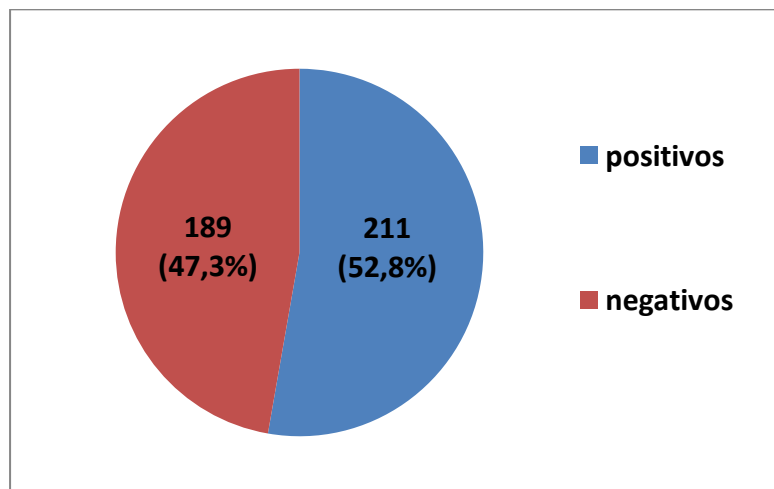


TABELA 5. Frequência de cães positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta de acordo com o sexo, Uberlândia/MG, 2010.

	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
MACHOS	80	110	190
%	42,3	57,7	100,0
FÊMEAS	109	101	210
%	51,9	49,1	100,0
TOTAL	189	211	400
%	47,2	52,8	100,0

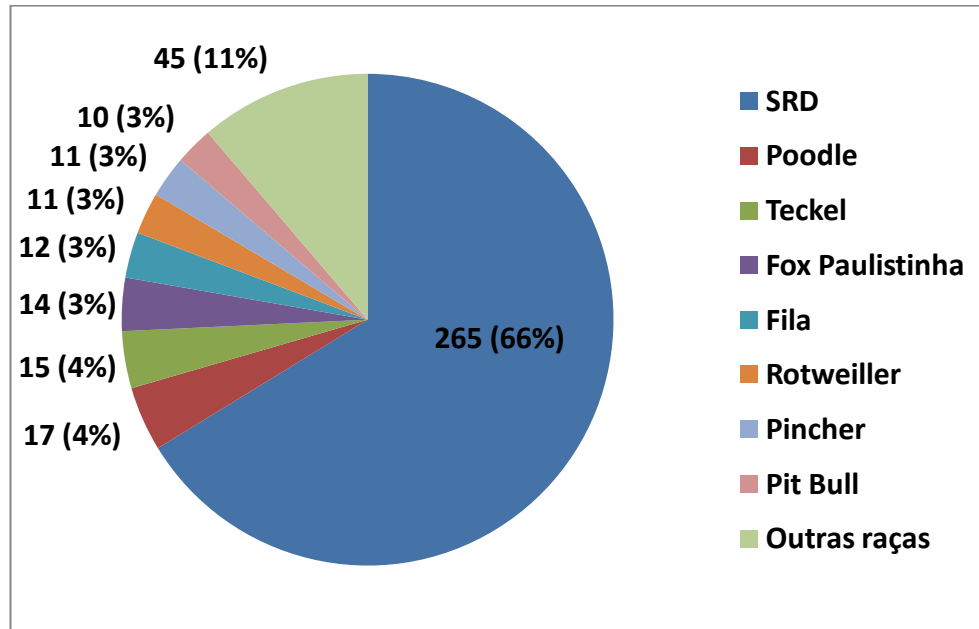
Qui-quadrado: 3,843; p= 0,057.

TABELA 6. Frequência de cães positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta classificados como adultos e jovens, Uberlândia/ MG, 2010.

	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
ADULTOS	145	187	332
%	43,7	56,3	100,0
JOVENS	44	24	68
%	64,7	35,2	100,0
TOTAL	189	211	400
%	47,2	52,8	100,0

Qui-quadrado: 10,016; p= 0,002.

FIGURA 6: Frequência das raças de cães amostradas, Uberlândia/MG, 2010.



SRD: sem raça definida.

Avaliando a população canina dos setores: centro, norte, sul, leste e oeste da cidade de Uberlândia, os cães errantes apresentaram um percentual de positividade (68,8%) muito maior que os doados (34,1%), apresentando uma inversão numérica entre estas duas variáveis, já que o percentual de negativos dos errantes foi de (31,25%) e dos doados (65,9%). O grupo com dono apresentou também um percentual superior de cães positivos (54,87%), mas o percentual de negativos não diferiu muito (45,13). Na análise das três categorias, errantes, doados e com dono, observa-se que os resultados de positivos e negativos foram influenciados ($p=0,002$) (TABELA 7).

Não houve diferença significativa nos resultados da RIFI em relação ao contato ou não dos cães por carrapatos, embora dentre os reativos, foi relatado que 188 cães tiveram contato prévio ou atual com carrapatos, contra 49 que nunca tiveram contato (TABELA 8). Proprietários que não souberam informar sobre o contato do seu cão com carrapatos não foram computados. Embora não tenha sido realizado exame clínico na procura de ectoparasitas, durante a colheita das amostras, oito cães apresentavam infestação por carrapatos, sendo quatro positivos

(um cão de captura, dois cães de doação e um com dono) e quatro negativos (um de doação, um com dono e dois da zona rural). Foram observadas em uma residência urbana, que embora com o relato de infestações constantes dos cães por carrapatos, a doença nunca se manifestou e também não reagiram ao RIFI. Na zona rural, onde em uma propriedade que teve infestação por carrapatos recentemente, os cães infestados eram negativos. Em outras duas residências com coabitação de cães, onde apenas um dos animais desenvolveu a doença, os demais cães eram reagentes, apesar de não ter tido a EMC clínica.

TABELA 7. Frequência de cães errantes, doados e com donos positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, procedentes dos setores centro, norte, sul, leste e oeste, Uberlândia/ MG, 2010.

	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
ERRANTES	20	44	64
%	31,2	68,8	100,0
DOADOS	29	15	44
%	65,9	34,1	100,0
COM DONOS	74	90	164
%	45,1	54,9	100,0
TOTAL	123	149	272
%	45,2	54,8	100,0

Qui-quadrado: 12,645; p= 0,002.

Na tabela 9 são apresentados os números e percentuais de positivos e negativos das diferentes localidades amostradas apresentando uma diferença altamente significativa ($p=0,001$). O maior percentual de positivos foi encontrado nos distritos (76,7%), seguido da cidade (55,9%) e depois zona rural com apenas (39,2%). A tabela 10 mostra os resultados da amostragem com a estratificação dos setores de Uberlândia ($p=0,001$), então há uma dependência entre eles e a RIFI, como no caso entre o centro e distritos com 25,0 e 76,7% de positivos e 75,0 e 23,7% de negativos respectivamente. Entre os setores, o centro apresentou o menor percentual de cães positivos (25,0%) e o setor oeste o maior percentual (62,3%) seguido pelo sul (53,1%).

TABELA 8. Frequência de cães positivos e negativos pela reação de imunofluorescência indireta que tiveram ou não contato com carrapatos, Uberlândia, 2010.

	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
CONTATO COM CARRAPATOS	80	108	188
%	42,5	57,5	100,0
SEM CONTATO COM CARRAPATOS	24	25	49
%	49,0	51,0	100,0
TOTAL NÚMERO	104	133	237
%	43,9	56,1	100,0

Qui-quadrado:0,652; p= 0,419.

A tabela 11 mostra os resultados obtidos na área rural, apresentando uma diferença significativa entre as diferentes localidades como observado nas áreas urbanas ($p=0.004$). A fazenda Sobradinho foi o local com o maior percentual de positivos 75,0%, seguida pela BR 050 sentido Araguari com 62,5% e BR 365 sentido Ituiutaba com 58.8%. Já a localidade com maior percentual de negativos (95,0%) foi na BR 050 sentido Uberaba, embora tenha o relato de uma fazenda que teve uma infestação com carrapatos há 6 meses em quatro cães, os quais foram todos negativos. O valor de P elevado vem pelas diferenças comparativas entre locais, como BR 050 sentido Araguari com 37,5% de negativos e 62,5% de positivos, enquanto que na BR 452 sentido Araxá são 62,5% de negativos e 37,5% de positivos, exatamente o inverso.

TABELA 9. Frequência de cães da cidade, distritos e zona rural, positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, Uberlândia/ MG, 2010.

PROCEDÊNCIA	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
CIDADE	123	150	273
%	45,1	54,9	100,0
DISTRITOS	7	23	30
%	23,3	76,7	100,0
ZONA RURAL	59	38	97
%	60,8	39,2	100,0
TOTAL	189	211	400
%	47,2	52,8	100,0

Qui-quadrado: 15,141; p= 0,001.

TABELA 10. Frequência de cães dos setores: centro, leste, norte, oeste e sul, distritos e zona rural e os resultados de positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, Uberlândia/MG, 2010.

PROCEDÊNCIA	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
CENTRO	6	2	8
%	75,0	25,0	100,0
DISTRITOS	7	23	30
%	23,3	76,7	100,0
LESTE	30	26	56
%	53,6	46,4	100,0
NORTE	19	30	49
%	38,8	61,2	100,0
OESTE	29	48	77
%	37,7	62,3	100,0
SUL	39	44	83
%	46,9	53,1	100,0
ZONA RURAL	59	38	97
%	60,8	39,2	100,0
TOTAL	189	211	400
%	47,2	52,8	100,0

Qui-quadrado: 20,827;p= 0,001.

TABELA 11. Frequência de cães da zona rural, positivos e negativos para *Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, Uberlândia/MG, 2010.

PROCEDÊNCIA	RIFI		TOTAL
	NEGATIVOS	POSITIVOS	
BR 050 - Araguari	6	10	16
%	37,5	62,5	100,0
BR 452 - Araxá	10	6	16
%	62,5	37,5	100,0
Fazenda Sobradinho - IFET	2	6	8
%	25,0	75,0	100,0
BR 365 - Ituiutaba	7	10	17
%	41,2	58,8	100,0
Represa de Miranda	2	1	3
%	66,7	33,3	100,0
Represa de Miranda I	1	1	2
%	50,0	50,0	100,0
BR 497 - Prata	9	6	15
%	60,0	40,0	100,0
BR 050 - Uberaba	19	1	20
%	95,0	5,0	100,0
TOTAL	56	41	97
%	57,7	42,3	100,0

Qui-quadrado: 19,817; p= 0,004.

5. Discussão

Os resultados sorológicos da prevalência da EMC em Uberlândia são altos 52,8%. No Rio Grande do Sul (SAITO et al., 2008) encontrou-se a prevalência mais baixa do país, 4,8%. Na cidade de Cuiabá (SILVA et al., 2010), observaram que 42% dos cães eram reagentes. Nos distritos de Cajazeiras e Itapuã de Salvador 35,6% dos caninos foram positivos (SOUZA et al., 2010). Em Monte Negro, Rondônia, 37,9% da população canina da cidade e 24,9% da área rural foi positiva (Aguiar, 2007a). Em Minas Gerais, existem dois estudos, em Novo Cruzeiro, uma região endêmica para febre maculosa, onde 17,81% dos cães eram positivos (GALVÃO et al., 2002) e nas zonas rurais de Belo Horizonte com 37,8%, Lavras 24,7% e Nanuque com 65,6% de reagentes (COSTA JR et al., 2007).

O estudo sorológico mostra, geralmente, um maior número de positivos que outras técnicas como a observação de mórulas no esfregaço sanguíneo que são observados somente em um pequeno número de cães que estão em fase de parasitemia elevada. Souza et al. (2010) detectaram que apenas 34,5% dos soropositivos amplificaram DNA de *E. canis*, esta diferença ocorre em regiões endêmicas onde muitos não desenvolvem a doença e outros eliminam a bactéria, mas permanecem os anticorpos. Na sorologia, são detectados animais na fase inicial da doença, em torno de 15 dias pós-infecção, doentes nas diferentes fases da doença e os convalescentes. Desta forma, cães que tiveram contato com a bactéria podem apresentar anticorpos por períodos longos como dois anos (IQBAL, CHAICHANASIRIWITHAYA e RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998).

Prevalências sorológicas são variáveis em todo o mundo. Na Tunísia, M'Ghirbi et al. (2009), detectaram 54,2% de soropositivos usando a RIFI. Na região da Sardenha, Itália, 46,7% de 1.000 amostrados eram reagentes à RIFI (COCCO et al., 2003). A soroprevalência de *E. canis* em Castilla-Léon, norte da Espanha foi de 19,2% dos cães pela RIFI (SÁINZ et al., 1996). No Japão a prevalência encontrada foi menor 10%, também usando a RIFI (WATANABE et al., 2004). Em um estudo avaliando a prevalência em estados americanos, pela detecção de anticorpos anti erlíquia utilizando o teste SNAP, os resultados foram variáveis entre localidades (regiões e estados) e entre 982.336 amostras o percentual de positivos foi de apenas 0,6% (BOWMAN et al., 2009). No sudeste do Canadá, a detecção de

anticorpos também foi baixa 1 reagente em 271 amostras (0,37%) (GARY et al., 2006) e algumas regiões parecem estar livres deste agente como o norte da Austrália (MASON et al., 2001).

Houve uma tendência ($p= 0,057$) dos cães machos serem mais positivos que as fêmeas. Aguiar et al. (2007) e Silva et al. (2010) não observaram diferenças entre sexo. Já, Costa Jr et al. (2007) encontraram um maior número de machos que fêmeas. Os achados do presente trabalho e de Costa Jr et al (2007) poderiam ser explicados pelos machos serem mais vagantes que as fêmeas. Borin et al (2009), nos diagnósticos hospitalares de Uberlândia, o número de fêmea diagnosticadas como positivas na citologia foi maior. No entanto, estes resultados possuem o viés de ter trabalhado com uma casuística hospitalar.

Animais adultos, acima de um ano de idade foram significativamente mais positivos que os jovens. O maior tempo de vida possibilita maior oportunidade de contato com a *E. canis*, justificando a maior positividade dos adultos. Cães com mais de 13 meses foram mais reagentes na Itália (COCCO, 2003). Costa Jr et al. (2007), em regiões rurais mineiras, verificaram maior positividade em animais com mais de cinco anos de idade, assim como encontrado em cães adultos de Israel que também foram mais reagentes na RIFI (BANETH et al., 1996). Nas amostras de Monte Negro (AGUIAR et al., 2007a) e Cuiabá (SILVA et al., 2010) não foram encontradas diferenças entre idade dos cães e prevalência da EMC. Nos atendimentos hospitalares de Uberlândia, os cães jovens foram mais prevalentes no desenvolvimento do quadro clínico de erliquiose, mostrando talvez sua menor resistência perante a primeira infecção (BORIN et al., 2009).

Durante a coleta das amostras de sangue, não se fazia uma busca por ectoparasitas, mesmo assim oito cães foram identificados infestados por carrapatos, e destes, metade eram reagentes. Entre os cães com dono, os proprietários eram indagados sobre o contato com carrapatos. Entretanto, o relato do contato ou não com carrapatos não influenciou o resultado positivo ou negativo da RIFI. Resultados semelhantes foram encontrados por Borin et al (2009). Sáinz et al. (1996) não encontraram diferenças de positividade em cães espanhóis com histórico de infestação por carrapatos daqueles sem. Em três áreas rurais de Minas Gerais a infestação por carrapatos foi significativa nos cães positivos (COSTA JR et al., 2007).

Em uma residência urbana, onde foram relatadas infestações constantes dos cães por carrapatos, e em uma propriedade rural que teve infestação por carrapatos recentemente, os cães infestados eram negativos. Portanto, nestes dois casos, os carrapatos domiciliados nestes locais provavelmente eram livres da *E. canis*. Utilizando o *R. sanguineus* para transmissão experimental da *E. canis*, Bremer et al. (2005) tiveram êxito na transmissão entre 50 e 70% dos casos. Populações de carrapatos com baixa taxa de infecção foram observadas, sugerindo que no repasto sanguíneo alguns vetores não são contaminados (AGUIAR et al., 2007a). Outro fato observado em duas residências com coabitação de cães, onde um cão já havia desenvolvido a doença, sendo este e os demais sororreativos, significando que alguns cães não desenvolvem a doença. Esta observação concorda com (HARRUS et al., 1998) que em regiões endêmica ocorrem muitos animais soropositivos, não desenvolvendo a doença. A dose do inóculo, condições físicas e imunológicas do hospedeiro podem influenciar no desenvolvimento ou não da doença (NEER e HARRUS, 2006).

A diferença de positividade em cães errantes foi significativa. O fato de estarem em condições higiênicas e alimentares deficientes propicia o desenvolvimento de inúmeras doenças. Como a principal forma de controle da EMC é com o uso de acaricidas sobre o ambiente e animais infestados com o *R. sanguineus*, estes animais não desfrutam deste benefício. Em um levantamento epidemiológico em Israel (BANETH et al., 1996), 23,9% dos cães que freqüentavam clínicas veterinária e 37,5% dos errantes foram reativos na RIFI.

Foram demonstradas diferenças de positividade entre localidades urbanas e rurais, indicando que algumas regiões foram mais propensas a doença, talvez por uma maior propagação de carrapatos e cães contaminados naquela região.

Os locais amostrados neste estudo mostraram-se muito diferentes quanto à prevalência da EMC. Foram encontradas diferenças entre área urbana e rural. Resultados entre cães que moram no meio urbano e rural são variáveis. Os resultados de Costa Jr et al. (2007) foram de positividade elevada como 76% na área rural de Nanuque/ MG. Na Espanha, cães da zona rural também foram mais positivos que da zona urbana (SÁINZ et al., 1996). A população da área rural é predominantemente pobre e seus animais geralmente infestados por carrapatos, associado à proximidade da floresta são fatores que possam influenciar na maior ocorrência na zona rural (CARVALHO et al., 2008).

Estudando a população de carrapatos em cães de Uberlândia também foi encontrada uma infestação maior na área rural (52,9%) que na área urbana (32,2%). No entanto, embora o *R. sanguineus* foi o mais encontrado na zona rural outras espécies de carrapato também foram encontradas (SZABÓ et al., 2010) e estas não transmitem a *E. canis*.

No presente trabalho, a menor prevalência na zona rural, pode ser explicada pela baixa densidade de animais na zona rural, com pouco trânsito de animais entre propriedades, ocorrência de diferentes espécies de carrapato e talvez pouco infectados pela *E. canis*, determinando a existência de localidades com baixas e altas prevalências. Em Rondônia, os cães das áreas rurais também tiveram menor prevalência que na urbana (AGUIAR et al., 2007a).

A população canina urbana deste estudo foi mais prevalente. Em Cuiabá, onde foi avaliada apenas a população canina urbana foram encontradas diferenças estatísticas entre os bairros estudados (SILVA et al., 2010). Dentre os setores urbanos, observou-se reatividade diferenciada entre setores e distritos. Embora Uberlândia apresente um índice de desenvolvimento urbano de 0,830, sendo superior ao estadual 0,766 e nacional 0,757 (PREFEITURA MUNICIPAL DE UBERLÂNDIA, 2009) possui bairros periféricos populosos, com baixo poder econômico e população canina elevada. Com os dados do último CENSO/ IBGE 2000 (SECRETARIA MUNICIPAL DE PLANEJAMENTO, 2010) é possível visualizar o rendimento nominal mensal (RNM) de setores e distritos de Uberlândia. O rendimento nominal mensal é a soma dos ganhos de uma pessoa com 10 anos ou mais de idade, proveniente do trabalho e de outras fontes, que é estimada pelo salário mínimo (SM). Assim os setores de Uberlândia, Central e Leste apresentam o maior número de famílias com renda entre 5-10 SM e nos demais setores Norte, Sul e Oeste a renda é de 3-5 SM. Nos distritos os valores são ainda menores de 1,5 a 2 SM por família. Se comparados estes dados com a reatividade da RIFI, os distritos e setores Oeste e Sul, que foram mais reagentes são também os que concentram menores SM por família.

Como exemplo, o Setor Oeste, que possui o maior número de cães vacinados (14.151) na campanha anti-rábica de 2009 (CCZ/ Uberlândia informações particulares). Estes locais com menor RNM geralmente apresentam uma densidade canina maior, casas agrupadas e construções propícias ao abrigo do *R. sanguineus*, associados ao controle deficiente do carrapato, podem acarretar na propagação

deles e maiores chances de ocorrência de doenças transmitidas por eles. Nestes bairros periféricos, são observados também muitos cães nas ruas, ajudando na difusão de doenças. Os hábitos gregários, errantes e andantes dos caninos facilitam a disseminação de doenças, dificultando um zoneamento efetivo, pois muitos cães das fazendas eram provenientes da cidade, e a população errante altamente positiva ajuda na disseminação por todo o município.

A EMC é considerada uma zoonose, onde o risco foi observado na Venezuela (PEREZ et al., 1996; UNVER et al., 2001). A alta incidência entre cães na cidade de Uberlândia confirma o caráter endêmico da doença e é um fato a ser monitorado e combatido, tendo em vista o risco à população humana.

No caso da EMC, a principal forma de controle da doença está no controle do vetor e o tratamento de cães doentes. Cães com donos responsáveis são bem alimentados, higienizados e recebem tratamentos profiláticos e curativos. Cães errantes, que não recebem qualquer forma de controle, foi o grupo com o maior taxa de positividade. Os errantes devem receber uma atenção especial dos agentes de saúde, o recolhimento das ruas e o encaminhando a abrigos ou a doação, são meios para diminuir a propagação de inúmeras doenças caninas. Medidas sanitárias públicas devem ser adotadas para o controle da população canina: como incentivar a posse responsável, castração de machos e fêmeas, controle de vetores e doenças de cães.

6. Conclusões

A população canina de Uberlândia apresenta uma prevalência alta de anticorpos anti *Ehrlichia* spp. Foram observados maiores números de reagentes entre os cães com idade superior a um ano de idade, nos errantes e nas regiões onde o desenvolvimento econômico da população humana era inferior.



Considerações Finais

O sequenciamento do gene 16S rRNA confirma que o isolado de Uberlândia é realmente *E. canis* e este apresenta identidade alta com os demais isolados já obtidos no Brasil e no mundo.

Os antígenos para reação de imunofluorescência indireta de dois isolados brasileiros de *E. canis*, São Paulo e Uberlândia, podem ser usados no diagnóstico da erliquiose monocítica canina, apresentando a mesma sensibilidade na identificação de animais positivos. No entanto, por apresentarem diferenças na titulação final, esta deve ser utilizada com restrições para qualquer que seja sua finalidade.

A erliquiose monocítica canina é endêmica em Uberlândia e foi confirmada pela alta prevalência de anticorpos anti *Ehrlichia* spp. usando a reação de imunofluorescência indireta. Os cães com mais de um ano de idade, errantes e os que residem em localidades com menor desenvolvimento econômico foram os grupos com maior número de reagentes.



Referências

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. São Paulo, 2006. 95f. Tese (Doutorado em Epidemiologia)-Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

AGUIAR, D. M., CAVALCANTE, G. T., PINTER, A., GENNARI, S. M., CAMARGO, L. M. A., LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 1, p. 126-132, jan. 2007a.

AGUIAR, D. M., SAITO, T. B., HAGIWARA, M. K., MACHADO, R. Z., LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, june. 2007b.

AGUIAR, D. M., HAGIWARA, M. K., LABRUNA, M. B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 489-93, july/ sept. 2008.

AGUIAR, D. M., ORLANDELLI, R. Reatividade cruzada entre diferentes isolados brasileiros de *Ehrlichia canis*. In: III Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária, 2009, Bonito. **Annais...** Bonito, III Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária, 2009, 1 CD.

AGUIRRE, E., SAINZ, A., DUNNER, S., AMASUTEGUI, I., LÓPEZ, L., RODRÍGUEZ-FRANCO, F., LUACES, I., CORTÉS, O., TESOURO, M. A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 365-372, nov. 2004.

AGUIRRE, E., AYLLÓN, T., SAINZ, A., AMASUTEGUI, I., VILLAESCUSA, A., RODRÍGUEZ-FRANCO, F., TESOURO, M. A. Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*. **Veterinary Journal**, London, v.182, n. 2, p. 301-305, nov. 2009.

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

ALVES, R. N. **Isolamento, propagação, caracterização genética e mecanismo de evasão de *Ehrlichia canis* in vitro**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

ANDEREG, P. I., PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 19, p. 3-8, mar/ abr. 1999.

ANDRÉ, M. R., ADANIA, C. H., MACHADO, R. Z., ALLEGRETTI, S. M., FELIPPE, P. A. N., SILVA, K. F., NAKAGHI, A. C. H. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 46, n. 3, p. 1017–1023, july 2010.

BANETH, M. R., WANER, T., KOPLAH, A., WEINSTEIN, S., KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**, London, v. 138, n. 11, p. 257-259, mar. 1996.

BARBOSA, F. C., BORGES, A. P. L., MUNDIM, A. V. Achados clínicos e hematológicos de cães com Babesiose e Ehrlichiose. Estudo retrospectivo. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2006, Ribeirão Preto. **Annais...** Ribeirão Preto, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006, p. 389.

BORIN, S., CRIVELENTI, L. Z., FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 566-571, june 2009.

BOUNOUS, D. I., HOSKINS, J. D., BOUDREAUX, M. K. O sistema hematopoiético. IN: _____ **Pediatria Veterinária: cães e gatos até 6 meses de idade**. São Paulo: Manole, 1992. cap. 11, p. 317-351.

BOWMAN, D., LITTLE, S. E. LORENTZEN, L., SHIELDS, J., SULLIVAN, M. P., CARLIN, M. P. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.160, n.1-2, p. 138–148, mar. 2009.

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

BREMER, W. G., SCHAEFER, J. J., WAGNER, E. R., EWING, S. A., RIKIHISA, Y., NEEDHAM, G. R., JITTAPALAPONG, S., MOORE, D. L., STICH, R. W. Transtadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 95-105, july 2005.

BULLA, C., TAKAHIRA, R. K. ARAÚJO Jr., J. P., TRINCA, L. A., LOPES, R. S., WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, Paris, v. 35, n. 1, p. 141–146, jan-feb. 2004.

CÁRDENAS, A. M., DOYLE, C. K., ZHANG, X., NETHERY, K., CORSTVET, R. E., WALKER, D. H., McBRIDE, J. W. Enzyme-Linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoprotein gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine immunology**, Washington. v. 14, n. 2, p. 123-128, feb. 2007.

CARDOSO, L. TUNA, J., VIEIRA, L., YISASCHAR-MEKUSZAS, Y, BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from North of Portugal. **Veterinary Journal**, London, v. 183, n. 2, p. 232-233, dec. 2010.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 4, p. 840-862, july 2004.

CARVALHO, E. S., WENCESLAU, A. A., CARLOS, R. S. A., ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 657-662, july 2008.

COCCO, R., SANNA, G., CILLARA, M. G., TOLA, S., XIMENES, L., PINNAPARPAGLIA, M. L., MASALA, G. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 990, p. 126–130, june 2003.

COSTA, J. O., SILVA, M., GUIMARÃES, M. P., BATISTA JUNIOR, J. A. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

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

COSTA, P. S. G., VALLE, L. M. C., BRIGATTE, M. E., GRECO, D. B. More About Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: Serological Evidence of Nine New Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 7-10, feb. 2006.

COSTA JR, L. M. REMBECK, K., RIBEIRO, M. F. B., BEELITZ, P., PFISTER, K., PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, n. 3, p. 673-676, nov. 2007.

COUTO, C. G. Doenças Rickettsiais In: BICHARD, S. J., SHERDING. R. J. **Manual Saunders**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1998, Cap. 10, p. 139-142.

DAGNONE, A. S., MORAIS, H. A., VIDOTTO, M. C., JOJIMA, F. S., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 285-290, nov. 2003.

DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L. A., BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil.: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba. v. 39, n. 1, p. 64-67, jan-feb. 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. London, **Parasites & Vectors**, London, v.1, n. 25, p.1-17, aug. 2008.

DATASUS. População residente Uberlândia, MG. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/popmg.def>. Acesso em: 31 abr.2010.

DAVOUST, B. L'ehrlichiose canine. **Le Point Veterinaire**, Paris, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DINIZ, P. P. P., SCHWARTZ, D. S., MORAIS, H. S., BREITSCHWERDT, E. B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, Larchmont, v.7, n.4, p. 689-697. dec. 2007.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v.28, p.418–419, 1935.

DOYLE, C. K., CARDENAS, A. M., AGUIAR, D. M., LABRUNA, M. B., NDIP, L. M., YU, X., McBRIDE, J. W. Molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 tandem repeats among isolates from different geographic locations. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, n. 1063, p. 433–435, dec. 2005a.

DOYLE, C. K., LABRUNA, M. B., BREITSCHWERDT, E. B., TANG, Y.W., CORSTVET, R. E., HEGARTY, B. C., BLOCH K. C., LI, P., WALKER, D. H.; McBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 7, n. 4, p. 504–510, oct. 2005b.

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

EMBRAPA. Monitoramento por satélite. Disponível em: <http://www.urbanizacao.cnpm.embrapa.br/conteudo/uf/mg.html>>. Acesso em: 31 abr. 2010.

GAJADHAR, A. A., LOBANOV, V., SCANDRETT, W. B., CAMPBELL, J., AL-ADHAMI, B. A novel *Ehrlichia* genotype detected in naturally infected cattle in North America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.173, n. 3-4, p. 324-329, oct. 2010.

GALVÃO, M. A. M., LAMOUNIER, J. A., BONOMO, E., TROPPIA, M. S., REZENDE, E. G., CALIC, S. B., CHAMONE, C. B., MACHADO, M. C., OTONI, M. E. A., LEITE, R. C., CARAM, C., MAFRA, C. L., WALKER, D. H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1593-1597, nov-dez. 2002.

GARY, A. T., WEBB, J. A., HEGARTY, B. C., BREITSCHWERDT, E. B. The low seroprevalence of tick-transmitted agents of disease in dogs from southern Ontario and Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 47, n. 12, p. 1194-1200, dec. 2006.

GENARO, F. F. **Ultraestrutura de células DH82 infectadas por *Ehrlichia canis* tratadas com doxiciclina e *Artemisia annua* L.** Uberlândia, MG. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

GÖTSCH, S., LESCHNIK, M., DUSCHER, G., BURGSTALLER, J. P., WILLE-PIAZZAI, W., JOACHIM, A. Ticks and hemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, p. 171–174, dec. 2009.

GROVES, M. G., DENNIS, G. M. AMYX, H. L., HUXOL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 36, n. 7, p. 937-940, july 1975.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, London, v. 41, n. 1, p. 95–8, oct. 1999.

HARRUS, S., KASS, P. H., KLEMENT, E., WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **The Veterinary Record**, London, v. 4, n. 141, p. 360-363, oct.1997.

HARRUS, S., WANER, T., AIZENBERG, I., FOLEY, J. E., POLAND, A. M., BARK, H. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 73-76, jan. 1998.

HARRUS, S., WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, London v. 187, n. 3, p. 292-296. mar. 2010.

HEGARTY, B.C., LEVY, M.G., GAGER, R.F., BREITSCHWERDT, E.B. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 9, n. 1, p. 32–38, jan. 1997.

HILDEBRANDT, P. K., HUXSOLL, D. L., WALKER, J. S., NIMS, R. M., TAYLOR, R., ANDREWS, M. Pathology of canine ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 34, n. 10, p. 1309-1320, oct.1973.

HUANG, C., HSIEH, Y. TSANG, C., CHUNG, Y. Sequence and phylogenetic analysis of the *gp200* protein of *Ehrlichia canis* from dogs in Taiwan. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 11, n. 4, p. 333-340, dec. 2010.

IBGE. Dados preliminares censo 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/censo2010/primeiros_dados_divulgados/index.php?uf=31>. Acesso em: 31 mar. 2010.

IQBAL, Z., RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissue of dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 281-287, dec. 1994.

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

KEYSARY, A., T., ROSNER, M., WARNER, C. K., DAWSON, J. C., ZASS, R., BIGGIE, K. L., HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 62, n. 3-4, p. 331-340, apr. 1996.

KOMNENOU, A. A., MYLONAKIS, M. E., KOUTI, V., TENDOMA, L., LEONTIDES, L., SKOUNTZOU, E., DESSIRIS, A., F. KOUTINAS, A. F., OFRI, R. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary Ophthalmology**, Osney Mead, v. 10, n. 3, p. 137-142, may-june 2007.

LABARTHE, N., PEREIRA, M. D. C., BARBARINI, O., McKEE, W., COIMBRA, C. A., HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 4, n. 1, p. 67-75, spring 2003.

LABRUNA, M. B. Biológica-ecologia de *Rhiphicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, suplemento 1, p. 123-124, set. 2004.

LABRUNA, M. B., McBRIDE, J. W., CAMARGO, L. M. A., AGUIAR, D. M., YABSLEY, M. J., DAVIDSON, W. R., STROMDAHL, E. Y., WILLIAMSON, P. C., STICH, R. W., LONG, S. W., CAMARGO, E. P., WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 189-195, jan. 2007.

LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1,159-174, mar. 1977.

LEGATZKI, K., JORGE, P. S. Erliquiose Canina. Uma doença emergente? **Nosso Clínico**, São Paulo, n. 26, p. 12-20, mar-abr. 2002.

LEVENHAGEN, M. A. **Mecanismos de sinalização celular envolvidos nos processos de proliferação e propagação de *Ehrlichia canis* “in vitro”**. Uberlândia, MG. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

LÓPEZ, L., VENTEO, A., AGUIRRE, E., GARCÍA, M., RODRÍGUEZ, M. J., AMUSÁTEGUI, I., TESOURO, M. A., VELA, C., SAINZ, A., RUEDA, P. Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 6, p. 635–642, nov. 2007.

MACEDO, E. A. **Características ultraestruturais de células parasitadas por *Ehrlichia spp.*, métodos diagnósticos e alterações histopatológicas em órgãos de cães com erliquiose de Uberlândia-MG**. 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

MACIEIRA, D. B., MESSICK, J. B., CERQUEIRA, A. D. E. M., FREIRE, I.M., LINHARES, G. F., ALMEIDA, N. K., ALMOSNY, N. R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MADRUGA, C. R., ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O. DOT-ELISA para detecção de anticorpos contra *Ehrlichia canis*. In: ____ **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 297-300.

MASON, R. J., LEE, J. M., CURRAN, J. M., MOSS, A., VAN DER HEIDE, B., DANIELS, P. W. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 79, n. 8, p. 559-562, aug. 2001.

MAVROMATIS, K., DOYLE, C. K., LYKIDIS, A., IVANOVA, N., FRANCINO, M., CHAIN, P., SHIN, M., Malfatti, S., LARIMER, F., COPELAND, A., DETTER, J. C., LAND, M., RICHARDSON, P. M., YU, X. J., WALKER, D. H., MCBRIDE, J. W., KYRPIDES, N. C. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n. 11, p. 4015–4023, june 2006.

- McBRIDE, J. W., YU, X. J., WALKER, D. H. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, New York, v. 6, n. 3, p. 392–399, may 1999.
- MENDONÇA, C. S., MUNDIM, A. V., COSTA, A. S., MORO, T. V. Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 167-174, jan-abr. 2005.
- M'GHIRBI, Y, GHORBEL, A., AMOURI, M., NEBAOUI, A., HADDAD, S., BOUATTOUR, A. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, n. 4, p.767–774, nov. 2009.
- MORAIS, H. A., HOSKINS, J., ALMOSNY, N. R. P., LABARTHE, N. Diretrizes gerais para o diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia* spp. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 48, p. 28-30, jan- fev. 2004.
- MOREIRA, S. M., BASTOS, C. V., ARAÚJO, R. B., SANTOS, M., PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, vol. 55, n. 2, p. 141-147, apr. 2003.
- MOREIRA, S. M., MACHADO, R., PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 958-960, jul-ago. 2005.
- MURPHY, G. E. EWING, S. A., WHITWORTH, L. C., FOX, J. C., KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325–339, nov. 1998.
- NDIP, L. M., NDIP, R. N., ESEMU, S. N., DICKMU, V. L., FOKAM, E. B., WALKER, D. H., McBRIDE, J. W. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 111 p. 59–66, nov. 2005.
- NEER, T. M., BREITSCHWERDT, E. B., GREENE, R. T., LAPPIN, M. R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, p. 309–315, may-june 2002.
- NEER, T. M., HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In GREENE, C. E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. Saint Louis, Saunders Elsevier, 2006, cap. 28, p. 203-232.
- NYINDO, M. B. A., M. RISTIC, D. L. HUXSOLL, SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: *In vitro* cultivation of the causative agent - *Ehrlichia canis*. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, 32:1651-1658. nov. 1971.

OHASHI, N., ZHI, N., ZHANG, Y., RIKIHISA, Y. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 1, p. 132-139, jan. 1998.

OLIVEIRA, D., NISHIMORI, C. T., COSTA, M. T., MACHADO, R. Z., CASTRO, M. B. Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados, através do "DOT-ELISA". **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 9, n. 1, p. 1-5, fev. 2000.

OLIVEIRA, L. S., OLIVEIRA, K. A., ALMEIDA, M. R., CONCEIÇÃO, I. G., GALVÃO, M. A. M., BOUYER, D., WALKER, D. H., MAFRA, C. L. Identificação molecular de *Ehrlichia canis* em uma população de cães em Viçosa/ MG e a relação da trombocitopenia e anemia com a ehrlichiose na população em estudo. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de Riquetsioses, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006, p. 383.

OLIVEIRA, T. M. F. S., FURUTA, P.F.S., DE CARVALHO, D., MACHADO, R. Z. A. study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 7-11, jan-mar. 2008.

OLIVEIRA, L. S., L. C. MOURÃO, L. C., OLIVEIRA, K. A., AGOSTIN, M. M., DE OLIVEIRA, A. C., M. R. DE ALMEIDA, A. C. M. R., FIETTO, J. L. R., CONCEIÇÃO, L. G., FILHO, J. D. R., GALVÃO, M. A. M., MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 15, suppl. 2, p. 53–54, dec. 2009.

ORIÁ, A. P., PEREIRA, P. M., LAUS, J. L. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1289-1295. jul-ago. 2004.

ORIÁ, A. P., DÓREA NETO, F. A., MACHADO, R. Z., SANTANA, A. E., GUERRA J. L., DA SILVA, V. L. D. PETER G. C. BEDFORD, P. G. C., LAUS, J. L. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 15, n. 2, p. 94-97, maio-ago. 2008.

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

PREFEITURA MUNICIPAL DE UBERLÂNDIA. Banco de Dados Integrados 2009. v. 3, 2009. Disponível em: <http://www.uberlandia.mg.gov.br/home_bdi.php>. Acesso em: 07 abr. 2010.

RAMOS, R, RAMOS, C, ARAÚJO, F, OLIVEIRA, R, SOUZA, I, PIMENTEL, D, GALINDO, M, SANTANA, M, ROSAS, E, FAUSTINO, M, ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, oct. 2010.

RIBEIRO, S. C. A., LEITE, R. F. B., MARRA, P. O. Prevalência da Erliquiose canina em Uberlândia - MG. XVI Semana Científica de Medicina Veterinária e Mostra da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, **Veterinária Notícias**, v. 9, suplemento 1, p. 29, 2003.

RIKIHISA, Y. Cross-reacting antigens between *Neorickettsia helminthoeca* and *Ehrlichia* species, shown by immunofluorescence and Western Immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 9, p. 2024-2029. sep. 1991.

RIKIHISA, Y., EWING, S. A., FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 9, p. 2107-2112, sep. 1994.

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

RISTIC, M., HOLLAND, C. J. Canine ehrlichiosis. In: WOLDEHIWET, Z. and RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993, p. 169–186.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I., ALBORNOZ, R. E. F., BOLIO, M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 75–79, jan. 2005.

SÁINZ, A, DELGADO, S. AMUSATEGUI, I., TESOURO, M. A., CÁRRNENES, P. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 29 n. 29, p. 1-7, nov. 1996.

SAITO, T. B., CUNHA-FILHO, N. A., PACHECO, R. C., FERREIRA, F., PAPPEN, F. G., FARIAS, N. A. R., LARSSON, C. E., LABRUNA, M. B. Canine infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in southern of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 1, p. 102-108, july 2008.

SANTOS, J. P., SANTOS, M. P., SILVA, T. K., MUNDIM, E. D., CABRAL, A. D., CABRAL, D. D. Frequência de hemoparasitas em cães (*Canis familiaris*) no município de Uberlândia, MG; Brasil: avaliação por esfregaço sanguíneo. In: XIII Congresso Brasileiro Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto. **Annais...** Ouro Preto, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. p. 372.

SANTOS, F., COPPEDE, J. S., PEREIRA, A. L., OLIVEIRA, L.P., ROBERTO, P.G., BENEDETTI, R. B., ZUCOLOTO, L. B., LUCAS, F., SOBREIRA, L., MARINS, M. 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, jan. 2009.

SECRETARIA MUNICIPAL DE PLANEJAMENTO DE UBERLÂNDIA. Tabela de rendimento nominal. Disponível em: <http://www.uberlandia.mg.gov.br/secretaria.php?id=17&id_cg=114>. Acesso em: 07 abr. 2010.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE UBERLÂNDIA. Relatório de Gestão 2009. Disponível em: <http://www.uberlandia.mg.gov.br/midia/documentos/saude/relatorio_gestao_sms_2009.pdf>. Acesso em: 07 de abr. 2010.

SILVA, J. N., ALMEIDA, A. B. P. F., SORTE, E. C. B, FREITAS, A. G., SANTOS, L. G. F., AGUIAR, D. M., SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 108-111, abr-jun. 2010.

SOUZA, B. M. P. S., LEAL, D. C., BARBOZA, D. C. P. M., UZÊDA, R. S., DE ALCÂNTARA, A. C., FERREIRA, F., LABRUNA, M. B., GONDIM, L. F. P., FRANKE, C. R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 89-93, abr-jun. 2010.

SPOLIDORIO, M. G., LABRUNA, M. B., MACHADO, R. Z., MORAES-FILHO, J., ZAGO, A. M., DONATELE, D. M., PINHEIRO, S. R., SILVEIRA, I., CALIARI, K. M., YOSHINARI, N. H. Survey for tick-borne zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 83, n. 1, p. 201-206, July 2010.

STITCH, RW, SCHAEFER, J. J., BREMER, W. G., NEEDHAM, G. R., JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 256-273, dec. 2008.

SWANGO, L. J., BANKENIPER, K. W., KONG, L. I. Infecções Bacterianas, Riquetsiais, Protozoais e outras IN: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992, cap. 46, p. 276-311.

SZABO, M. P. J., MUKAI, L. S., ROSA, P. C. S., BECHARA, G. H. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters and guinea pigs to infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 43-50, 1995.

SZABÓ, M. P. J., CUNHA, T. M., PINTER, A., VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experiment Applied in Acarology**, Amsterdam, v. 25, n. 10-11, p. 909-916. oct. 2001.

SZABÓ, M. P. J., de SOUZA, L. G. A., OLEGÁRIO, M. M. M., FERREIRA, F. A., PAJUABA NETO, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 57, n. 1-2, p. 72–74, apr. 2010.

SWANGO, L. J.; BANKENIPER, K. W.; KONG, L. I. Infecções bacterianas, riquetsiais, protozoais e outras. IN: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, nov.1994.

TORRES, H. M., MASSARD, C.L., FIGUEIREDO, M. J., FERREIRA, T., ALMOSNY, N. R. P. Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 77–82, maio-ago. 2002.

UENO, T. E. H., AGUIAR, D. M., PACHECO, R. C., RICHTZENHAIN, L. J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C., MEGID, J., LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, jul-set. 2009.

UNVER, A., PEREZ, M., ORELLANA, N., HUANG, H., RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2788–2793, aug. 2001.

VIEIRA, R. F. C., BIONDO, A. B., GUIMARÃES, A. M. S., SANTOS, A. P., SANTOS, R. P., DUTRA, L. H., DINIZ, P. P. V.P., MORAIS, H. A., MESSICK, J. B., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12, jan-mar. 2011.

VIERA, S. Bioestatística: tópicos avançados. 2ed, Rio de Janeiro, Campus, 2004, 216p.

VINASCO, J., LI, O., ALVARADO, A., DIAZ, D., HOYOS, L., TABACHI, L., SIRIGIREDDY, K., FERGUSON, C., MORO, M. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n. 8, p. 2716-2719, aug. 2007.

WANER, T., HARRUS, S., WEISS, D. J., BARK, H., KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 177-182, sep. 1995.

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

WATANABE, M, OKUDA, M, TSUJI, M, INOKUMA, H. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 101-107, sep. 2004.

WELLMAN, M. L., KRAKOWKA, S., JACOBS, R. M., KOCIBA, G. J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 24, n 3, p. 223 – 229. mar. 1988.

WIKIPÉDIA. Uberlândia. Disponível em:
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Uberl%C3%A2ndia>>. Acesso em: 31 mar. 2011.

YU, X., McBRIDE, J.W., WALKER, D.H. Restriction and expansion of *Ehrlichia canis* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n.3-4, p. 337-346, feb. 2007.

ZHANG, X., LUO, T., KEYSARY, A., BANETH, G., MIYASHIRO, S., STRENGER, C., WANER, T., McBRIDE, J. W. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strain. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 7, p. 1080-1088, july 2008.

ANEXOS

Autorização

Eu, ..., portador do documento de identidade ou CPF número
.....,
residente.....
....., autoriza a
coleta de amostra sangue do meu cão denominado para ser
utilizada no Projeto de Doutorado intitulado “Diagnóstico sorológico, isolamento e
caracterização genética da erliquiose canina na região de Uberlândia”.

Uberlândia,.....de.....de 20.....



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 108/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 051/10**

Projeto Pesquisa: "Diagnóstico sorológico, isolamento e caracterização genética da erliquiose canina na região de Uberlândia".

Pesquisador Responsável: Marcelo Emilio Beletti

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 06 de julho de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente do CEUA/UFU