



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia canis* EM CÃES
SINTOMÁTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E
ANÁLISE DE VARIABILIDADE EM REGIÕES
GENÔMICAS DE REPETIÇÃO**

MARIANA DE FÁTIMA GOIS CESAR

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia canis* EM CÃES SINTOMÁTICOS ATENDIDOS NO
HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E ANÁLISE DE
VARIABILIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE REPETIÇÃO**

MARIANA DE FÁTIMA GOIS CESAR

ORIENTADOR: RICARDO TITZE DE ALMEIDA

CO-ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 007 / 2008

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia canis* EM CÃES SINTOMÁTICOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E ANÁLISE DE VARIABILIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE REPETIÇÃO

MARIANA DE FÁTIMA GOIS CESAR

DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Saúde Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Animal.

APROVADA POR:

Ricardo Titze de Almeida (ORIENTADOR)

Doutorado em Patologia Molecular

Professor adjunto UnB - FAV

Simone Perecmanis (EXAMINADOR INTERNO)

Doutorado em Patologia Molecular

Professor Adjunto UnB – FAV

Nádia Regina Pereira Almosny (EXAMINADOR EXTERNO)

Doutorado em Medicina Veterinária (Parasitologia Veterinária)

Professor Associado da Universidade Federal Fluminense

BRASÍLIA/DF, 12 de dezembro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

CESAR, MARIANA DE FÁTIMA GOIS.

Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição / Mariana de Fátima Gois Cesar; orientação de Ricardo Titze de Almeida – Brasília: Universidade de Brasília, 2008. 57 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

1. Animais de companhia 2. Doenças infecciosas em animais domésticos
3. Erliquiose 4. Variabilidade genética em *Ehrlichia canis*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 57 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Mariana de Fátima Gois Cesar

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição

GRAU: Mestre

ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização, por escrito, do autor.

Mariana de Fátima Gois cesar

CPF 688.192.931-53

Endereço: SQN 108 bl. K. apt. 501 – Asa Norte

CEP: 71744-110 Brasília/DF - Brasil

(005561) 3272-1740 marianafgc@yahoo.com.br

SUMÁRIO

	PÁGINA
PREFÁCIO	v
RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO I	
Introdução	01
Referencial Teórico.....	03
Descrição do microrganismo.....	03
Histórico e distribuição geográfica.....	03
Prevalência de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> no Brasil.....	05
Prevalência de <i>Ehrlichia canis</i> no Brasil.....	06
Patogenia e sinais clínicos.....	07
Métodos de diagnóstico.....	11
Marcadores moleculares para estudos filogenéticos.....	13
Marcadores moleculares para a tipagem microbiana.....	15
OBJETIVOS.....	18
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO II.....	
Artigo 1 – Ocorrência de <i>Ehrlichia canis</i> em cães sintomáticos de Brasília e sua correlação com as alterações hematológicas de anemia e trombocitopenia.....	27
Artigo 2 – Análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição de <i>Ehrlichia canis</i>	36
CAPÍTULO III	
Considerações finais.....	54
ANEXO I – Resumo publicado no 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia.....	55

PREFÁCIO

O presente estudo descreve a ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e investiga sua variabilidade em regiões genômicas de repetição. O tema da dissertação foi abordado em três capítulos.

O capítulo I trata de uma revisão geral da erliquiose monocítica canina, abrangendo os principais aspectos da enfermidade, como caracterização do agente, histórico e distribuição geográfica, prevalência do vetor e da *E. canis* no Brasil, patogenia, sinais clínicos e métodos diagnósticos. Os dois últimos tópicos do capítulo I, *Marcadores moleculares para estudos filogenéticos* e *Marcadores moleculares para a tipagem molecular*, discorrem brevemente sobre caracterização genética microbiana, baseada em análises moleculares.

O capítulo II apresenta os resultados obtidos na realização do estudo, no formato de artigo científico. O artigo de número 1 aborda a ocorrência de *E. canis* em cães de Brasília e suas correlações hematológicas, enquanto o segundo artigo trata da investigação de variabilidade em regiões genômicas de repetição identificadas em *E. canis*.

Finalmente, o capítulo III refere-se às considerações finais do trabalho de dissertação, onde são apresentadas as principais contribuições científicas do presente estudo.

RESUMO

Ehrlichia canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). A doença, transmitida pelo carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus*, é endêmica em diversas regiões do Brasil. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de *E. canis* em cães sintomáticos e avaliar suas correlações com os achados hematológicos de anemia e trombocitopenia. Além disso, foram analisadas seis diferentes regiões genômicas de repetição para a identificação de variabilidade genética em linhagens de *E. canis*. A amostra incluiu cães admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (n = 86). A reação de polimerização em cadeia (PCR), tendo como alvo específico seqüências da região 16S rRNA de *E. canis*, foi utilizada na identificação do microrganismo em amostras de sangue. Em seguida, um grupo de 31 amostras aleatórias, foram examinadas para avaliar a ocorrência de trombocitopenia e anemia. Vinte e quatro animais (27,9%) foram positivos para *E. canis*. A presença de *E. canis* foi positivamente relacionada com a trombocitopenia (66,7% versus 16,6%, P <0,05, teste exato de Fisher) e anemia (56,2% versus 13,3%, P <0,05, teste exato de Fisher). A segunda fase deste trabalho investigou a variabilidade genética microbiana. A divergência genética de 11 cepas controle de *E. canis* foi analisada em alelos de seis diferentes regiões contendo repetições em *tandem*, ecaj_0017, ecaj_0062, ecaj_0109, ecaj_0221, ecaj_0472, e ecaj_0530. Três dos seis loci selecionados mostraram polimorfismo genético: ecaj_0017, ecaj_0109, e ecaj_0221. A maior variação ocorreu em ecaj_0109, com alelos apresentando 0, 5, 6, ou 18 repetições. O gene ecaj_0109 (GP36) também apresentou alta variabilidade entre 34 amostras de sangue de cães positivos para *E. canis* de Brasília; as linhagens exibiram alelos com 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18 e 21 unidades repetitivas. Concluindo, os resultados revelaram infecção por *E. canis* em cães da cidade de Brasília. A região deve ser considerada área endêmica. A prevalência de *E. canis* foi maior nos cães trombocitopênicos e anêmicos. A variabilidade encontrada em três regiões genômicas de repetição discriminou diferentes linhagens genéticas entre os isolados brasileiros de *E. canis*.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, trombocitopenia, anemia, PCR, variabilidade genética, repetições em *tandem*.

ABSTRACT

Ehrlichia canis is the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis (CME). This cosmopolitan disease is transmitted by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, and occurs endemically in various regions of Brazil. The present study was aimed to investigate the presence of *E. canis* DNA in symptomatic dogs and its relationships with anemia and thrombocytopenia. In addition, we analysed six different tandem repeats genomic regions for genetic variability among *E. canis* lineages. The sample included dogs admitted to the Veterinary Hospital at the University of Brasília (n=86). We used a polymerase chain reaction (PCR) targeted to *E. canis* specific 16S rRNA sequences to identify the microorganism in dog blood samples. After that, a subset of 31 aleatory blood samples were examined for the occurrence of thrombocytopenia and anemia. A total of 24 animals (27.9%) were positive for *E. canis*. The presence of *E. canis* DNA was positively related to thrombocytopenia (66.7% versus 16.6%, $P<0.05$, Fisher's exact test) and anemia (56.2% versus 13.3%, $P<0.05$, Fisher's exact test). The second phase of this work focused on the microbial genetic variability. We analyzed 11 control strains for allelic variability in six different genomic VNTRs named ecaj_0017, ecaj_0062, ecaj_0109, ecaj_0221, ecaj_0472, and ecaj_0530. Three of the six loci showed genetic polymorphism: ecaj_0017, ecaj_0109, and ecaj_0221. The higher variability occurred in ecaj_0109 which showed alleles with 0, 5, 6, or 18 repeats. Ecaj_0109 (GP36 gene) also presented high variability among 34 *E. canis* positive dog blood samples from Brasília; the lineages displayed alleles with 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, and 21 repeat units. In conclusion, our data showed *E. canis* infection in dogs from the city of Brasília, Central-West Brazil; the region should be considered an endemic area. The prevalence of *E. canis* was higher in thrombocytopenic and anemic dogs. The variability found in three different repeat genomic loci discriminated divergent genetic lineages among Brazilian *E. canis* isolates.

Keywords: *Ehrlichia canis*, thrombocytopenia, anemia, PCR, genetic variability, tandem repeats.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa que acomete principalmente cães domésticos. *Ehrlichia canis* é o agente etiológico da EMC e tem como principal vetor o carrapato marrom dos cães, *Rhipicephalus sanguineus* (Harrus et al., 1999a; Lappin, 2001; Waner et al., 2001; Dagnone et al., 2001a). Tratam-se de bactérias Gram-negativas e intracelulares obrigatórias de células mononucleares sanguíneas (McBride et al., 1996; Almosny et al., 2002; Greene, 2005).

O período de incubação da infecção por *E. canis* é de 8 a 20 dias. A doença pode manifestar-se nas fases aguda, subclínica e crônica, caracterizadas por anormalidades clínicas e hematológicas (Harrus et al., 1999a; Machado, 2004; Greene, 2005). Febre, anorexia, depressão, perda de peso, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, distúrbios cardíacos e respiratórios, assim como alterações nervosas e oculares, são os sinais clínicos mais freqüentes (Moreira et al., 2003; Castro et al., 2004; Machado, 2004). Os principais achados laboratoriais são trombocitopenia, leucopenia e anemia normocítica normocrômica (Lappin, 2001; Almosny et al., 2002; Mendonça et al., 2005; Nakaghi et al., 2008).

O diagnóstico presuntivo da infecção por *E. canis* é baseado no conjunto de sinais clínicos, alterações hematológicas e bioquímicas indicativas de erliquiose (Lappin, 2001; Dagnone et al., 2001a; Greene, 2005; Pinyoowong et al., 2007). Exames laboratoriais que auxiliam o diagnóstico definitivo incluem a identificação de mórulas intracelulares em esfregaço sanguíneo, detecção de anticorpos específicos contra o agente infectante, detecção do DNA do patógeno por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR) e/ou cultura celular do microrganismo (McBride et al., 1996; Keysary et al., 2001b; Waner et al., 2001; Trapp et al., 2002; Dagnone et al., 2001a; Bulla et al., 2004; Harrus et al., 2004b; Macieira et al., 2005; Aguiar, et al., 2007b).

A técnica de PCR tem sido utilizada como alternativa ao diagnóstico microbiológico de doenças infecciosas, pois possibilita a detecção de seqüências específicas do DNA do patógeno de interesse em diferentes amostras, tais como

sangue, urina ou tecidos dos hospedeiros. No diagnóstico da erliquiose, esta técnica tem possibilitado identificar seqüências de *E. canis* de forma rápida, sensível e específica, a partir de amostras de sangue, medula óssea e baço (Harrus et al., 2004b).

Técnicas de biologia molecular também têm sido amplamente utilizadas para identificação e seqüenciamento de genes, permitindo investigações sobre microrganismos de relevância médica (Keysary et al., 1996a; McBride et al., 1996; Suksawat et al., 2001b; Unver et al., 2001; Fenollar & Raoult, 2004; Doyle et al., 2005a; Maggi *et al.*, 2006; Siarkou et al., 2007). No genoma de seres eucariontes e procariontes foram identificadas regiões de repetição formadas por seqüências de nucleotídeos idênticas ou com variações, e que podem apresentar variabilidade no número de unidades de cada repetição. Tais regiões foram denominadas repetições em *tandem* de número variável - *variable number of tandem repeats* (VNTR) (Van Belkum et al., 1998; Fenollar & Raoult, 2004). Utilizando-se a técnica de PCR, com *primers* que delimitam a região de repetição, pode-se determinar o número de unidades repetitivas por eletroforese simples, com base no tamanho das seqüências amplificadas (Van Belkum *et al.*, 1998; Titze-de-Almeida *et al.* 2004). A utilização de VNTR como marcadores moleculares para tipagem de microrganismos tem possibilitado identificar isolados de forma sensível e específica, com rapidez, baixo custo, facilidade de implementação, uso e interpretação de resultados. Desta forma, a análise de variabilidade das regiões contendo VNTR contribui para estudos sobre a epidemiologia de microrganismos de interesse (Van Belkum et al., 1998; Doyle et al., 2006b).

A infecção por *E. canis* é relatada mundialmente, incluindo países da Europa, Ásia, África e do continente americano. No Brasil, o primeiro caso de EMC foi descrito em Belo Horizonte (MG) em 1973. Posteriormente, surgiram relatos da doença em todas as regiões do país e a EMC é considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas, onde a concentração do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* é mais elevada (Dagnone et al., 2001a, Labruna & Pereira, 2001a; Dagnone et al., 2003b; Moreira et al., 2003; Bulla et al., 2004; Machado, 2004; Alves et al., 2005; Macieira et al., 2005; Aguiar et al., 2007a; Labruna et al., 2007b; Santos et al., 2007; Carvalho et al. 2008). Até o presente momento, não foram descritos dados sobre a presença e comportamento de *E. canis* no Distrito Federal, apesar da ocorrência da doença na região.

Com base no exposto, a avaliação da ocorrência de *E. canis* em cães do Distrito Federal é de grande relevância, pois possibilitaria avaliar a epidemiologia do microrganismo, relacionando-a com alterações hematológicas da doença. Além disto, a recente identificação de genes contendo regiões de repetição em *tandem* em *E. canis* (Mavromatis et al., 2006) pode contribuir para investigações sobre variabilidade genética microbiana. Desta forma, considerou-se relevante identificar a presença de *E. canis* em cães sintomáticos admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e investigar a variabilidade em regiões genômicas de repetição em *tandem* de linhagens de *E. canis*.

REFERENCIAL TEÓRICO

Descrição do microrganismo

Ehrlichia spp. são riquetsias transmitidas por carrapato. A classificação taxonômica recentemente proposta por Dumler et al. (2001) baseia-se em análises de seqüências nucleotídicas dos genes 16S rRNA, groESL e proteínas de superfície. Assim, *Ehrlichia* spp. pertencem à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae. O gênero *Ehrlichia* inclui as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. ewingii* (Brenner et al., 2004). Tratam-se de bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, que se replicam dentro de vacúolos de células eucarióticas dos hospedeiros, particularmente em células hematopoiéticas maduras ou imaturas. *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. muris* são comumente detectadas em monócitos e macrófagos. A espécie *E. ruminantium* é freqüentemente identificada em células endoteliais, neutrófilos e macrófagos, enquanto *E. ewingii* geralmente infecta neutrófilos do sangue periférico (Rikihisa, 1991a; Dumler, et al., 2001).

As espécies *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* podem causar a infecção natural em cães. Não há relatos da infecção natural por *E. ruminantium* em cães e, nos animais infectados experimentalmente não ocorrem anormalidades clínicas (Breitschwerdt et al,1998). *E. canis* é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). O microrganismo pode ser visualizado no citoplasma de células sanguíneas mononucleares como colônias de corpos cocóides, denominadas mórulas intracitoplasmáticas. O ciclo infeccioso de *E. canis* pode ser observado microscopicamente. Primeiramente, a bactéria penetra nos monócitos do hospedeiro

por fagocitose dando origem aos corpúsculos elementares. No interior dos monócitos ocorre o crescimento e multiplicação dos corpúsculos elementares, que evoluem para corpúsculos iniciais. Entre o sétimo e o décimo segundo dia subseqüentes, os corpúsculos iniciais desenvolvem-se e dividem-se em novos corpúsculos elementares, formando as mórulas características deste agente infeccioso. Mais de uma mórula pode coexistir dentro de uma mesma célula, e cada mórula contém vários corpúsculos elementares. Rikihisa (1991a) observou, em cultivo celular, mórulas contendo mais de 100 organismos. Após três ou quatro dias, as mórulas liberam os corpúsculos elementares com a ruptura da célula hospedeira ou por um processo de exocitose, e assim, o ciclo infeccioso se repete (Macedo, 2007).

Rhipicephalus sanguineus é o principal vetor de *E. canis*. Este carrapato infecta-se ao ingerir sangue com leucócitos parasitados por *E. canis*, geralmente na segunda ou terceira semana de infecção do cão (Rikihisa et al., 1991a; Almosny et al., 2002). O microrganismo multiplica-se dentro de hemócitos e nas células da glândula salivar e, eventualmente, penetra no trato digestivo, onde infecta as células do trato intestinal. Ocorre transmissão transestadial (Dagnone et al., 2001a; Aguiar et al., 2007b; Dantas-Torres, 2008). Durante o repasto sanguíneo em outro cão, a picada do carrapato estimula uma resposta inflamatória local e o fluxo de células mononucleares favorece a disseminação da bactéria no novo hospedeiro. O carrapato infectado pode transmitir *E. canis* por até cinco meses (Rikihisa, 1991; Dagnone et al., 2001; Almosny et al., 2002; Macedo, 2007).

Embora *E. canis* não seja considerada um patógeno de humanos, há relatos na literatura da identificação deste microrganismo causando doença clínica em pacientes humanos. O papel do cão como reservatório da infecção por *E. canis* para humanos e, do carrapato *R. sanguineus* como vetor acidental, permanece pouco esclarecido (Perez et al., 1996; Unver et al., 2001).

Histórico e distribuição geográfica

A erliquiose canina foi originalmente descrita na Algéria em 1935. A doença adquiriu um significado especial durante a guerra do Vietnã (1959-1975), onde foi reconhecida como causa da morte de centenas de cães do exército americano (Rikihisa et al., 1992b; Keysary et al., 1996a). A distribuição da EMC está

relacionada com a distribuição do *Rhipicephalus sanguineus*, principal carrapato vetor da *E. canis*. Atualmente, *E. canis* encontra-se distribuída em países da Ásia, Europa, África e América (Rodgers et al., 1989; Keysary et al., 1996a; Unver et al., 2001; Parola et al., 2003; Rodrigues-Vivas et al., 2005; Marsilio et al., 2006; Pinyoowong et al., 2007; Venzal et al., 2007; Matjila et al., 2008).

No Brasil, a EMC é de ampla ocorrência, principalmente em áreas urbanas, devido à alta prevalência do *Rhipicephalus sanguineus* (Aguiar et al., 2007b). O primeiro relato de infecção por *E. canis* no país data de 1973, na cidade de Belo Horizonte (Costa et al., 1973). Posteriormente, a presença do agente da EMC foi descrita em São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Bahia e em outros estados do país (Dagnone et al., 2001a; Dagnone et al., 2003b; Moreira et al., 2003; Bulla et al., 2004; Machado, 2004; Alves et al., 2005; Macieira et al., 2005; Aguiar et al., 2007a; Labruna et al., 2007b; Santos et al., 2007; Carvalho et al. 2008).

Prevalência de *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil

A exposição do cão ao carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* é considerado o principal fator de risco para a aquisição da EMC no Brasil (Dagnone et al., 2001a; Moreira et al., 2003; Costa et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Dantas-Torres, 2008a). Aguiar et al. (2007a) identificaram, pela primeira vez no país, a infecção natural por *E. canis* em carrapatos *R. sanguineus* obtidos nos estados de Rondônia e São Paulo, testados por PCR para um fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia*. O estudo também mostrou que a prevalência de *E. canis*, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), é superior nos cães de área urbana em relação aos de área rural no município de Monte Negro, estado de Rondônia (37,9% versus 24,8%).

Vários estudos verificaram que a espécie de carrapato *R. sanguineus* é a mais prevalente em cães de áreas urbanas. Nas áreas urbanas, a disponibilidade de habitat para as fases de vida livre do *R. sanguineus* é abundante, uma vez que a espécie tem por hábito penetrar em pequenos buracos ou frestas em superfícies de cimento ou madeira. A espécie foi introduzida no Brasil durante a colonização e já na década de 30 encontrava-se distribuída em todas regiões do país (Labruna et al.,

2001a; Dantas-Torres, 2008b). Embora seja um carrapato adaptado às condições das áreas urbanas, algumas formas de criação de cães em áreas rurais (por exemplo, a construção de canis) possibilitam o estabelecimento do *R. sanguineus* nessas áreas. Este fato foi observado em um levantamento realizado por Labruna et al. (2001a), em cães de áreas rurais do norte do Paraná, onde o *R. sanguineus* foi a espécie mais prevalente (6,7%), com taxa de infestação média de 2,5 carrapatos por cão.

Frequências bem superiores são observadas em áreas urbanas. A prevalência do *R. sanguineus* em cães de rua da cidade de Porto Alegre foi de 93,2%, com taxas de infestação média de 24 carrapatos por cão (Ribeiro et al., 1997). Na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Rodrigues et al (2001) analisaram, em áreas peri-urbanas, a prevalência de carrapatos em cães de rua recolhidos por diferentes instituições. *R. sanguineus* foi o carrapato mais prevalente em cães de duas instituições avaliadas (63,33% e 56,81%). Os resultados deste estudo corroboram com dados obtidos em Goiânia, onde a prevalência de *R. sanguineus* em cães de rua foi de 67,5% (Rodrigues et al., 2001). Também na cidade de Juiz de Fora, Soares et al. (2006) verificaram maior prevalência de *R. sanguineus* em cães que habitavam casas (35%) em relação aos cães residentes em apartamentos (2%). Neste trabalho, foi pesquisada a presença de *E. canis* pela análise do esfregaço sanguíneo, identificando-se o microrganismo em 16% dos cães das casas com quintais.

Prevalência de *Ehrlichia canis* no Brasil

A erliquiose canina encontra-se distribuída em várias regiões do país. Recentes trabalhos demonstram que, em média, 20 a 30% dos cães admitidos em hospitais e clínicas veterinárias em vários estados do Sudeste, Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, apresentam anticorpos contra antígenos de *E. canis* e/ou são positivos nos testes de PCR (Dagnone et al., 2001a; Aguiar et al., 2007b). Fatores epidemiológicos relacionados às condições climáticas, distribuição do vetor, população sob estudo, comportamento animal e habitat, assim como a metodologia empregada na investigação do agente, podem afetar os níveis de prevalência da erliquiose canina no Brasil (Dagnone et al., 2001a).

Na cidade de Botucatu (SP), 30,9% dos cães foram positivos para a presença do gene 16S rRNA de *E. canis* (Bulla et al. 2004). Em Ribeirão preto, Santos et al. (2007) identificaram DNA do microrganismo em 38,9% na população de cães sob estudo. Outra pesquisa realizada em uma área rural do estado de São Paulo indicou uma prevalência de 45,2% do agente da EMC, utilizando o método de *nested* PCR. (Macieira et al., 2005). Na cidade de São Paulo, 68% dos cães, alguns com sintomas sugestivos de erliquiose canina, atendidos no Hospital Veterinário da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, apresentaram títulos compatíveis com a presença de anticorpos anti-*E. canis* (Aguiar et al., 2007b).

Moreira et al. (2003), em um estudo retrospectivo da casuística clínica de erliquiose em cães atendidos entre março de 1998 e setembro de 2001 na cidade de Belo Horizonte, analisaram 194 fichas clínicas de animais com suspeita de hemoparasitoses. Trinta e um cães (15,9%) apresentaram *E. canis* no exame parasitológico direto de esfregaços sangüíneos. A soro-prevalência da erliquiose canina, investigada em três regiões rurais distintas do estado de Minas Gerais, demonstrou a presença de anticorpos anti-*E. canis* em 65,6% dos cães em Nanuque, 37,8% em Belo Horizonte e 24,7% em Lavras (Costa et al., 2007).

Uma análise na população de cães com trombocitopenia, atendidos em Hospital Veterinário no sul do Brasil, encontrou 20% de prevalência da infecção por *E. canis*, identificada por PCR (Dagnone et al., 2003b). Na cidade de Londrina, de um total de 381 cães testados para a presença de anticorpos contra *E. canis*, 87 (23%) foram soropositivos (Trapp et al., 2006).

Quanto à região nordeste, estudos realizados nas cidades de Ilhéus e Itabuna demonstraram variação na prevalência da doença. Em 2007, 36% dos cães analisados foram positivos para anticorpos anti-*E. canis* (Carlos et al., 2007). No ano de 2008, em cães testados por PCR, detectou-se o DNA do agente em apenas 7,8% das amostras (Carvalho et al., 2008).

O método utilizado para a pesquisa do agente pode explicar, em parte, as diferenças nas taxas de prevalência da doença. Técnicas baseadas na detecção de anticorpos podem indicar uma infecção prévia ou atual e, ainda, apresentar reatividade cruzada com outros microrganismos (Warner et al., 2001b). As técnicas moleculares, como a PCR, identificam seqüências genômicas específicas do agente e tendem a ser mais sensíveis e específicas (Maggi et al., 2006).

Patogenia e sinais clínicos

O período de incubação da EMC varia de uma a três semanas e, em geral, a infecção caracteriza-se por febre, depressão e anorexia (Rikihisa et al., 1991a; Dagnone et al., 2001a). A doença pode apresentar três fases: aguda, subclínica e crônica. A fase aguda tem duração de duas a quatro semanas. O microrganismo infecta as células mononucleares, replica-se e dissemina-se para órgãos do hospedeiro como fígado, baço, linfonodos e pulmões. Nesta fase, os sinais clínicos são inespecíficos e incluem febre, secreção ocular e nasal, anorexia, depressão, perda de peso, dispnéia, linfadenopatia, vasculite, sinais neurológicos, musculares, oculares e poliartrite. Os achados laboratoriais freqüentemente observados são trombocitopenia, anemia e leucopenia (Rodgers et al., 1989; Harrus et al., 1999a; Dagnone et al., 2001a). Após a fase aguda, o animal pode apresentar cura ou desenvolver a doença de forma subclínica, ou seja, sem sinais clínicos evidentes, apesar da presença da *E. canis* no organismo. Em cães infectados experimentalmente, o achado laboratorial mais freqüente na infecção subclínica foi a trombocitopenia, associada a altos títulos de anticorpos contra *E. canis* (Waner et al., 1997a). Esta fase pode persistir por anos (Waner et al., 1997a). Cães imunocompetentes provavelmente eliminarão o parasita, enquanto cães com a resposta imune insuficiente tendem a desenvolver a fase crônica da doença.

A fase crônica pode instalar-se após a fase subclínica, variando de leve a severa. A forma crônica leve é caracterizada por sinais clínicos vagos como apatia, depressão e perda de peso. Esta forma geralmente não é fatal e responde ao tratamento. A forma crônica grave é freqüentemente fatal, caso não seja devidamente tratada. Caracteriza-se por anemia, leucopenia, trombocitopenia, comprometimento da medula óssea, depressão, anorexia, emaciação e hemorragias. Em particular, esplenomegalia e hepatomegalia são mais comuns nesta fase crônica da doença (Rodgers et al., 1989; Dagnone et al., 2001a).

A severidade da doença aparentemente depende do grau de infecção. Há evidências de que mecanismos de defesa inata possam eliminar o organismo das células infectadas com baixas quantidades de *Ehrlichia*. Gaunti et al. (1996) demonstraram que, nesta condição, não houve alteração significativa na concentração de plaquetas e nos títulos de anticorpos anti-*E. canis*. No entanto, cães que receberam altas doses do inóculo de *E. canis* (20 a 100 vezes superior)

desenvolveram a infecção, evidenciada por trombocitopenia, aumento nos títulos de anticorpos e cultura de sangue positiva para *E. canis*.

O ingresso de *Ehrlichia* em células hospedeiras pode ocorrer sem a lise das células infectadas. No caso de células epiteliais intestinais, experimentos *in vitro* permitiram observar a formação de uma monocamada firmemente conectada a zonas de junções intercelulares, favorecendo a transmissão da *Ehrlichia* por um processo de exocitose da célula infectada e endocitose da célula adjacente (Rikihisa et al., 1991a). Evidências indicam que as espécies de *Ehrlichia* apresentam tropismo tecidual. Células infectadas por *E. canis*, por exemplo, são comumente encontradas nos pulmões, rins, baço, olhos e meninges do cão. A epistaxe é causada por hemorragias características nos pulmões ou mucosa nasal (Rikihisa et al., 1991a; Dagnone et al., 2001a).

Os achados patológicos durante a necropsia freqüentemente incluem hemorragia petequial no tecido subcutâneo e na maioria dos órgãos afetados, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia generalizada e edema dos membros. Os achados microscópicos mais comuns são o infiltrado de células do sistema reticuloendotelial e plasmocitose em vários órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso, rins, pulmões, fígado e tecido linfóide. Tais infiltrados celulares e a proliferação linfocítica modificam a arquitetura microscópica de órgãos como linfonodos e baço (Castro et al., 2004).

Mecanismos imunológicos estão envolvidos na fisiopatologia da erliquiose, fato evidenciado pelos achados de linfadenopatia, esplenomegalia, hiperplasia linforreticular em áreas corticais de linfonodos, acúmulo periportal de células mononucleares, assim como infiltrado mononuclear em interstício renal e glomerulonefrite. Estudos com infecção experimental de *E. canis* em cães têm permitido avaliar as alterações imunológicas da doença. Há intensa infiltração de plasmócitos em órgãos parenquimatosos, sendo que os animais comumente apresentam teste de Coombs e de autoaglutinação positivos (Harrus et al., 1999a; Castro et al., 2004). A ativação de células T é necessária para a interação entre a resposta imune humoral e celular, e uma efetiva destruição intracelular do parasita. Além disto, tem sido proposto que a imunidade celular desempenha um papel importante na patogênese da erliquiose canina, determinada por um aumento das células T citotóxicas durante a infecção, o que resulta em aumento da citotoxicidade mediada por células (Castro et al., 2004).

Doenças concomitantes podem intensificar os sinais clínicos da EMC. Considerando-se que o *R. sanguineus* é transmissor de outros hemoparasitas, é relativamente comum encontrar infecções mistas causadas por *Anaplasma platys*, *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii* subs. *Berkhoffi* e *Hepatozoon canis*. Infecções por duas ou mais espécies diferentes de *Ehrlichia* também já foram identificadas em cães. Entretanto, dificilmente diferenciam-se clinicamente as infecções simples daquelas mistas (Breitschwerdt et al., 1998; Kordick et al., 1999; O'Dwyer et al., 2001; Moreira et al., 2003; Doyle et al., 2005; Yabsley et al., 2008).

As principais alterações hematológicas provocadas pela EMC incluem trombocitopenia, anemia e leucopenia (Harrus et al., 1999a; Dagnone et al., 2001a; Almosny et al., 2002; Bulla et al., 2004; Machado, 2004).

A trombocitopenia é considerada a anormalidade hematológica característica de cães infectados por *E. canis*. Esta alteração envolve vários processos, incluindo o aumento no consumo de plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, aumento do seqüestro esplênico, destruição imunomediada (principalmente na fase aguda), decréscimo na produção de plaquetas devido a hipoplasia medular (fase crônica) e/ou diminuição da vida média das células. A trombocitopenia pode ser ainda secundária a aumentos na concentração do fator de inibição-migração plaquetária, que parece intensificar o seqüestro e estase de plaquetas, levando à sua redução no sangue periférico (Harrus et al., 1999a; Bulla et al., 2004). A destruição imunomediada foi demonstrada pela presença de anticorpos anti-plaquetas (APA) no soro de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. Além disso, existem evidências de que a interação dos anticorpos APA com as glicoproteínas de membrana das plaquetas é a causa das disfunções plaquetárias, em particular a inibição da agregação plaquetária, durante a fase aguda da doença (Harrus et al., 1999a).

Bulla et al. (2004) sugeriram que a utilização de contagem de plaquetas como teste de rastreamento da infecção por *E. canis* em área endêmica é um indicador viável para direcionar o diagnóstico. Santos et al. (2007) corroboraram esta afirmação, mas apontam a necessidade de confirmação do diagnóstico por testes complementares, tais como a análise de esfregaços sanguíneos ou PCR. O estudo mostrou alta prevalência de *E. canis* entre os cães trombocitopênicos. Entretanto, 46,7% dos cães trombocitopênicos avaliados estavam infectados com *Babesia* spp., *Anaplasma platys* ou, ainda, nenhum dos três agentes mostrou-se presente. Além

disto, houve uma alta incidência de *E. canis* em cães não-trombocitopênicos (25,4%) (Santos et al., 2007). Neste mesmo sentido, Macieira et al. (2005) verificaram que a trombocitopenia não é um achado específico para se chegar à conclusão de infecção por *E. canis* e que, assim, não deve ser utilizada isoladamente no estabelecimento de um diagnóstico de EMC, mesmo em regiões endêmicas para a doença. Dagnone et al. (2003b) e Trapp et al. (2006) relataram a infrequente ocorrência da erliquiose em cães trombocitopênicos no sul do Brasil, sugerindo uma diferente forma de apresentação da doença nessa região.

Outras alterações hematológicas comumente associadas à EMC são a anemia e a leucopenia. Há evidências de que o mecanismo imunológico responsável pela indução da leucopenia seja também responsável pelo desenvolvimento da anemia normocítica normocrômica. Os eritrócitos seriam removidos da circulação pelo sistema monócitos/macrófagos e lisados pelo complemento, devido a uma reação de hipersensibilidade do tipo II, em adição ao déficit de eritropoiese na medula óssea. É comum ocorrer positividade no teste de Coombs, que evidencia os anticorpos contra antígenos dos eritrócitos, em cães infectados por *E. canis* (Moreira et al., 2003). A vasculite generalizada está associada à produção de interleucina-1 (IL-1), a qual desempenha uma importante função na marginalização e adesão dos leucócitos na parede vascular e, conseqüentemente, leva ao maior acúmulo de células no foco da inflamação. Estudos preliminares realizados no Brasil, mostram maior prevalência de erliquiose em cães anêmicos em relação aos trombocitopênicos. Moreira et al. (2003) observaram que 70,3% dos cães infectados por *E. canis* apresentavam anemia, enquanto 50% foram trombocitopênicos e 30% leucopênicos. A anemia normocítica normocrômica também foi o achado mais freqüente em cães com PCR positivo para o DNA erliquial no estudo de Macieira et al. (2005).

Embora a trombocitopenia seja, na maioria dos casos, a alteração hematológica mais evidente da infecção por *E. canis* em cães, diferenças na prevalência de distúrbios hematológicos podem estar relacionados a fatores como patogenicidade do agente, coinfeção com outros microrganismos, diferente estágio clínico da doença (agudo, subclínico ou crônico) ou grau de eficiência da resposta imune do hospedeiro.

Métodos de diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da EMC é comumente baseado no conjunto de alterações clínicas e hematológicas. Para o diagnóstico definitivo, vários métodos de detecção do agente ou de anticorpos específicos estão atualmente disponíveis.

A pesquisa de mórulas intracitoplasmáticas características de *E. canis* em lâminas de esfregaço de sangue periférico é uma opção viável para o diagnóstico definitivo. Entretanto, a sensibilidade do método é baixa, já que o microrganismo está presente em pequeno número na corrente sanguínea durante a infecção e a proporção de células infectadas pode ser menor do que 1% (Dagnone et al., 2001a; Lappin, 2001).

Outra alternativa diagnóstica é o cultivo *in vitro* de *E. canis*, que pode ser realizado em células de linhagem originária de histiocitoma canino – DH82 (Aguiar et al., 2007b). Várias linhagens celulares têm se mostrado úteis para o isolamento *in vitro* de *E. canis*, como o macrófago peritoneal canino, o monócito primário canino, a célula endotelial humana e as células macrofágicas de camundongos BALB/C (Keysary et al., 2001b; Aguiar et al., 2007b). O isolamento de *E. canis* em cultura de células demonstra ser uma técnica sensível e definitiva para o diagnóstico da erliquiose, porém não é conveniente para uso na rotina laboratorial por ser laboriosa, requerendo estrutura física e equipamentos adequados. Além disto, o cultivo demanda duas a seis semanas para obtenção de resultados positivos (Iqbal et al., 1994).

A detecção de anticorpos específicos contra *E. canis* tem sido o método diagnóstico mais amplamente utilizado nos laboratórios veterinários. O teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é capaz de detectar anticorpos anti-*E. canis* no sétimo dia pós-infecção (pi). Entretanto, estes testes podem indicar apenas exposição prévia ao microrganismo. Após o tratamento, os títulos de anticorpos diminuem lenta e gradualmente; o animal torna-se comumente negativo após 15 a 30 meses, mesmo com a eliminação do agente. Em áreas endêmicas, cães podem apresentar um alto título de IgG para *E. canis*, sem demonstrar a doença clinicamente, causando um aumento no número de falsos-positivos nessas regiões (Perille & Matus, 1991; Bulla et al., 2004). Assim, a principal desvantagem dos métodos sorológicos é a incapacidade de distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia. Além disto, pode ocorrer reação cruzada com outras espécies de *Ehrlichia* (Wen et al., 1997a; Murphy et al., 1998; Suksawat et al., 2000a; Dagnone et

al., 2001a). Warner et al. (2001b) enfatizam que a interpretação dos resultados de exames sorológicos deve considerar o curso da doença, a reatividade cruzada com outras espécies de *Ehrlichia*, infecções múltiplas com outros agentes transmitidos por carrapato e, também, títulos de anticorpos persistentes após o tratamento.

A introdução de técnicas moleculares para a detecção de *E. canis* tem permitido um diagnóstico rápido, sensível e específico para a erliquiose, nas fases aguda e crônica da doença. Neste sentido, a técnica de PCR também é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia*, pela detecção de seqüências específicas no DNA dos microrganismos. Vários trabalhos ressaltam que a utilização da *nested-PCR* aumenta a sensibilidade da técnica (Iqbal et al., 1994; Mc Bride et al., 1996; Wen et al., 1997a). Entretanto, uma análise comparativa entre a PCR (gene *dsb*) e a *nested-PCR* (16S rRNA), realizada em 24 amostras sanguíneas de cães naturalmente infectados por *E. canis*, demonstrou que as duas técnicas são adequadas ao diagnóstico da EMC (Machado, 2004). Outros alvos moleculares, específicos para a identificação de seqüências do DNA de *E. canis* e utilizados em PCR de etapa única, vêm demonstrando serem igualmente sensíveis e específicos em relação à técnica de *nested-PCR*, com as vantagens adicionais de reduzir falsos-positivos devido à contaminação por *amplicons* da primeira etapa, além de abreviar o tempo de execução (Alves et al., 2005; Marsílio et al., 2006; Vinasco et al., 2007). Recentemente, Doyle et al (2005c), desenvolveram um protocolo de PCR em tempo real (*real-time PCR*) no qual é possível detectar e diferenciar importantes espécies de *Ehrlichia* em uma única reação de amplificação do gene *dsb*, com satisfatória sensibilidade analítica. A técnica foi capaz de distinguir as espécies *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. canis*, detectando também coinfeções em uma mesma amostra (Doyle et al., 2005c).

Marcadores moleculares para estudos filogenéticos

O conhecimento do genoma microbiano mediante técnicas de biologia molecular, tem permitido identificar seqüências espécie-específicas para o diagnóstico molecular e também para embasar estudos de filogenia (La Fontaine & Tollervey 2001; Suksawat et al., 2001b).

O gene 16S rRNA é considerado o principal marcador molecular para filogenia bacteriana, sendo utilizado mundialmente com o objetivo de caracterizar

cepas de diferentes localidades. Além de conter regiões altamente conservadas, o gene 16S rRNA também apresenta regiões de hipervariabilidade, as quais podem fornecer seqüências espécie-específicas úteis para a indentificação bacteriana. Visto que o gene 16S rRNA apresenta alto nível de conservação estrutural e baixa taxa de evolução, níveis de divergência de seqüências maiores que 0,5%, na comparação entre seqüências quase completas do gene 16S rRNA dos membros do gênero *Ehrlichia*, são consideradas suficientes para classificar os organismos como espécies diferentes (La Fontaine & Tollervey 2001; Wen et al., 2002b). Baseados na análise do gene 16S rRNA, Suksawat et al. (2001b) concluíram que as espécies de *Ehrlichia* encontradas em dois cães coinfectados por *E. canis*, *E. equi* e *E. platys*, procedentes da Venezuela e Tailândia, eram similares entre si e similares às respectivas seqüências destes microrganismos depositadas no GenBank, não sustentando, neste trabalho, a hipótese de novas espécies. Os autores consideram ainda que, apesar de existirem regiões com microheterogenicidade dentro de um mesmo organismo, muitas vezes as diferenças encontradas devem-se a erros de sequenciamento ou erros na reação de PCR (Suksawat et al., 2001b). Unver et al. (2001), mediante análise do gene 16S rRNA, caracterizaram e comprovaram que o agente isolado de cães e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, na Venezuela, infectados com *E. canis* era idêntico ao agente previamente isolado em um caso humano de erliquiose ocorrido também na Venezuela. Estes, por conseguinte, apresentavam similaridade de 99,9% com a cepa Oklahoma de *E. canis*. Com base nos resultados, os autores sugerem que o cão serviria de reservatório e o *Rhipicephalus sanguineus* seria um potencial vetor para a infecção por *E. canis* em humanos (Unver et al., 2001). No estudo de Wen et al. (2002b), a análise de seqüências do gene 16S rRNA revelou que o novo agente, encontrado em carrapato *Boophilus microplus* no Tibet, seria um membro do gênero *Ehrlichia*, principalmente relacionado a *E. chaffeensis* mas também muito próximo a *E. canis*, *E. ewingii* e *E. muris*. O nível de divergência entre as seqüências do novo agente erliquial do Tibet e membros do gênero *Ehrlichia* foi de aproximadamente 1 a 2%. Segundo os autores, esta diferença deveria ser suficiente para classificar o novo agente como uma nova espécie do gênero *Ehrlichia* (Wen et al., 2002b). Na Tailândia, Pinyoowong et al. (2007) relatam que os isolados de *E. canis* da região estão intimamente relacionados e formam um único grupo com *E. canis* de diferentes países. Siarkou et al. (2007) compararam, utilizando os *primers* universais do gene

16S rRNA, isolados de *E. canis* envolvidos nas formas mielossupressivas e não-mielossupressivas da EMC. Os autores concluíram que os isolados das duas formas apresentam o mesmo genótipo do gene 16S rRNA, assim como demonstram 100% de similaridade com as cepas de *E. canis* da Venezuela, Brasil, Turquia e Tailândia. Estes resultados concordam com relatos anteriores que confirmam a pequena variação genética do gene 16S rRNA entre diferentes isolados de *E. canis* (Unver et al., 2003; Parola et al., 2003; Aguirre et al., 2004).

Estudos de genes adicionais são realizados com o objetivo de aprimorar a identificação e classificação das espécies de *Ehrlichia*. Árvores filogenéticas derivadas de seqüências de nucleotídeos do gene *groESL* confirmam as relações entre as espécies de *Ehrlichia*, previamente determinadas pelo gene 16S rRNA. Outros genes, por exemplo, *ankA*, *gltA* e genes de proteínas de superfície, tem fornecido dados complementares para estudos filogenéticos de linhagens do gênero *Ehrlichia* (Ohashi et al., 1998; Inokuma et al., 2001; Dumler et al., 2001).

Apesar da utilidade do gene 16S rRNA para a identificação de espécies bacterianas, por ser altamente conservado, este gene demonstra limitada variabilidade entre os isolados de uma mesma espécie, não permitindo serem diferenciados ou classificados dentro de subtipos ou cepas (Olive & Bean, 1999). Desta forma, outros marcadores moleculares são necessários para a tipagem de indivíduos de uma mesma espécie.

Marcadores moleculares para a tipagem microbiana

A ocorrência de doenças infecciosas muitas vezes resulta da exposição a uma fonte comum do agente etiológico. Geralmente, o agente etiológico causador de da infecção é obtido a partir de um ancestral comum cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estreitamente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em uma infecção têm uma relação clonal, ou seja, uma origem em comum. Os organismos com relação clonal são membros da mesma espécie que compartilham fatores de virulência, traços bioquímicos e características genômicas semelhantes. No entanto, pode ocorrer variabilidade genética entre indivíduos de uma única espécie, isolados a partir de diferentes fontes, em diferentes momentos e em diferentes regiões geográficas. Estes organismos podem ser

diferenciados ou classificados em subtipos ou cepas mediante o uso de marcadores moleculares específicos (Olive & Bean, 1999).

O processo de subtipagem é epidemiologicamente importante para o reconhecimento dos focos da infecção e identificação de cepas virulentas do microrganismo, assim como para o monitoramento de programas de vacinação e vigilância. Qualquer método de tipagem deve ter alta capacidade discriminatória, sendo capaz de diferenciar claramente isolados independentes, tais como aqueles que se encontram em regiões geograficamente distintas da fonte do organismo. Ao mesmo tempo, deve demonstrar proximidade entre os organismos geneticamente relacionados, descendentes de um ancestral comum. A escolha de um método de tipagem molecular depende das necessidades, nível de qualificação e recursos do laboratório. Recentemente, métodos baseados na análise de regiões de repetição (*tandem repeats*) do genoma de microrganismos têm fornecido uma metodologia simples e de alta resolução na identificação de isolados (Chang et al., 2007).

Regiões de repetição no DNA correspondem a seqüências de nucleotídeos que se repetem em bloco e são adjacentes umas às outras, daí a denominação de *tandem repeats*. Foram inicialmente definidas como regiões mini e microsátélites, sendo classificadas em *short sequence repeats* (SSR), *short tandem repeats* (STR) ou *variable number of tandem repeats* (VNTR). As SSR e STR encontram-se dispersas em várias regiões de genoma, enquanto as VNTR estão associadas a um único locus genético (Van Belkum et al., 1998).

Em seres humanos, regiões de repetição ocorrem freqüentemente, abrangendo aproximadamente 10% ou mais do genoma (Benson, 1999). Atualmente, estas regiões também têm sido identificadas de modo progressivo em procariontes, sendo encontrados em microrganismos de relevância médica (Van Belkum et al., 1998; Chang et al., 2007). A identificação da variabilidade nas regiões de repetição é de considerável importância, pois a mesma pode estar associada com mudanças fenotípicas, o que sugere sua importância funcional (O'Dushlaine & Shields, 2006). Assim, regiões de repetição em *tandem* estão relacionadas a funções reguladoras, embora a grande maioria ainda permaneça com funções desconhecidas. Em procariontes, algumas regiões de repetição no DNA parecem ter ligação com os mecanismos de adaptação, virulência e patogenicidade das bactérias (Van Belkum et al., 1998; Benson, 1999). Deneud & Vergnaud (2004)

citam que a freqüente observação de genes contendo regiões de repetições, muitas vezes associados à proteínas de membrana externa, sugere que esses genes permitam a adaptação ao ambiente e, desta forma, podem ser pontos de mutação resultantes de uma seleção positiva.

A análise de múltiplas regiões de VNTR, em inglês designada como *multiple locus variable number tandem repeats analysis* (MLVA), é resultante da identificação de lócus de variabilidade no genoma microbiano. A tipagem de microrganismos pelo método MLVA depende da correta seleção dos marcadores (regiões de VNTR). Individualmente, estes marcadores não fornecem informações relevantes sobre grupos de microrganismos, por apresentarem muita variabilidade ou demonstrarem um alto nível de homoplasia. No entanto, a combinação de regiões independentes, devidamente selecionadas, pode ser altamente discriminatória (Le Flèche et al., 2001a; Denoeud & Vergnaud, 2004; Le Flèche et al., 2004b). Com o surgimento da técnica de PCR, *primers* que delimitam a região de repetição são construídos e o polimorfismo no número de unidades repetitivas (VNTR) é visualizado por eletroforese simples, sendo o número de repetições calculado com base no tamanho das seqüências amplificadas (Van Belkum et al., 1998; Titze-de-Almeida et al. 2004).

A utilização de VNTRs como marcadores moleculares para tipagem de microrganismos tem possibilitado identificar isolados de forma sensível e específica, com rapidez, baixo custo, facilidade de implementação, uso e interpretação de resultados. Atualmente, o método vem sendo utilizado para a tipagem de diversas espécies de bactérias, incluindo *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Xylella fastidiosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* e *Neisseria meningitides* (Le Flèche et al., 2001; Denoeud & Vergnaud, 2004; Titze-de-Almeida et al. 2004; Chang et al., 2007).

Mavromatis et al. (2006) identificaram regiões de repetição em *tandem* em 12 genes no genoma da *Ehrlichia canis*. Os genes identificados foram denominados ecaj_0017, ecaj_0060, ecaj_0062, ecaj_0109, ecaj_0220, ecaj_0221, ecaj_0387, ecaj_0472, ecaj_0529, ecaj_0530, ecaj_07 e ecaj_0716. O gene ecaj_0109 expressa a glicoproteína de superfície GP36. De acordo com Doyle et al. (2006b), diferentes isolados de *E. canis* (Jake, Oklahoma e Demon) apresentaram diferenças no número de repetições da GP36. Ainda segundo Doyle et al. (2006b), em bactérias patogênicas, estas glicoproteínas têm sido funcionalmente caracterizadas,

incluindo adesinas, toxinas e proteínas envolvidas na estabilidade estrutural ou mobilidade do microrganismo. Algumas glicoproteínas bacterianas são altamente imunogênicas, destacando uma possível função no desenvolvimento de imunidade protetora. Os sítios de glicosilação da GP36 foram encontrados somente nas regiões de repetição das proteínas, que correspondiam às regiões de imunorreatividade, salientando-se a importância destas regiões.

Concluindo, a identificação de VNTRs no genoma de *E. canis*, selecionadas para serem utilizadas como possíveis marcadores moleculares, visando investigar a variabilidade genética de diferentes isolados, auxiliaria no conhecimento sobre a biologia desse microrganismo. Além disso, poderia indicar se existem diferenças de patogenicidade, virulência e resistência microbiana entre os genótipos de *Ehrlichia canis*.

OBJETIVOS

- Determinar a ocorrência de *E. canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília;
- Avaliar a correlação entre a presença de *E. canis* e a ocorrência de trombocitopenia e anemia;
- Investigar a variabilidade genética em regiões de repetição em *tandem* de isolados e linhagens de *E. canis*.

REFERÊNCIAS

- 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. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p. 126-132, 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**, v. 37, p. 796-802, 2007b.
- AGUIRRE, E.; SAINZ, A.; DUNNER, S.; AMUSATEGUI, I.; LÓPEZ, L.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; LUACES, I.; CORTÉS, O; TESOURO, M. A. First isolation and molecular characterization of *E. canis* in Spain. *Vet. Parasitol.*, v. 125, p. 365-372, 2004.

- ALMOSNY, N. R. P & MASSARD, C. L. Erliquiose. In: **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. Almosny, N. R. P. (1ª Ed) L.F. Livros, Rio de Janeiro, p. 14-56, 2002.
- ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 49-54, 2005.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 537-580, 1999.
- BRENNER, D. J.; KRIEG N. R. AND STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd edition, 2004.
- BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2645-2651, 1998.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR., J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WEIDMEYER, D.C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, v. 35, p. 141-146, 2004.
- CARLOS, R.S.A.; MUNIZ NETA, E.S.; SPAGNOL, F.H.; OLIVEIRA, L.S.; BRITO, R.L.L.; ALBUQUERQUE, G.R.; ALMOSNY, N.R.P. Freqüência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.16, p.117-120, 2007.
- CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; CARLOS, R.S.A. AND ALBUQUERQUE G.R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 7, p. 657-662, 2008.
- CASTRO, M.B; MACHADO, R.Z; AQUINO L.P.C.T; ALESSI A.C; COSTA M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasitol.**, v.119, p.73-86, 2004.
- CHANG, CHIA-HUNG; CHANG, YU-CHUNG; UNDERWOOD, A.; CHIOU, CHIEN-SHUN; KAO, CHENG-YAN. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 416-421, 2007.
- COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA JÚNIOR, J.A. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.25, p.199-200, 1973.
- COSTA, L. M. JR.; 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**, v. 174, p. 673–676, 2007.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, v. 22, p.191-201, 2001a.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 117, p. 285-290, 2003b.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Vet. Parasitol.**, v. 152, p. 173-185, 2008a.
- DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites and Vectors**, 1:25, 2008b.
- DENOEUDE, F. & VERGNAUD, G. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. **BMC Bioinformatics**, 2004, 5:4.
- DOYLE, C.K.; CARDENAS, A.M.; AGUIAR, D.M.; LABRUNA, M.B.; NDIP, L.M.; YU, XUE-JIE; MCBRIDE, J.W. Molecular Characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 Tandem Repeats among Isolates from Different Geographic Locations. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1063, p. 433–435, 2005a.
- DOYLE, C.K.; NETHERY, K.A.; POPOV, V.L.; MCBRIDE, J.W. Differentially Expressed and Secreted Major Immunoreactive Protein Orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* Elicit Early Antibody Responses to Epitopes on Glycosylated Tandem Repeats. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 711-720, 2006b.
- 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**, v. 7, p. 504-510, 2005c.
- DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., 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 HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.
- FENOLLAR, F. & RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **APMIS**, v. 112, p. 785-807, 2004.
- GAUNT, S. D; CORSTVET, R. E.; BERRY, C. M.; BRENNAN, B. Isolation of *Ehrlichia canis* from Dogs following Subcutaneous Inoculation. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1429–1432, 1996.

- GREENE, C.E. In: Greene, C.E. (3^a Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. W.B. Saunders, Philadelphia, 1440 p., 2005.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2745–2749, 1999a.
- HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment of Experimental *Ehrlichia canis* Infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 4488-4490, 2004b.
- INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of *Ehrlichia*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3031–3039. 2001.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W. & RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine Ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p. 1658-1662, 1994.
- KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C.K.; DAWSON, J.E.; ZASS, R.; BIGGIE, K.L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel., **Vet. Parasitol.**, v. 62, p. 331-340, 1996a.
- KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 13, p. 521-523, 2001b.
- KORDICK, S. K.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; SOUTHWICK, K. L.; COLITZ, C. M.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY, J. M.; RUMBOUGH, R.; MCPHERSON, J. T.; MACCORMACK, J. N. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2631–2638, 1999.
- LABRUNA, M.B. & PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clin. Vet.**, v. 30, p. 24-32, 2001a.
- 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. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 189-195, 2007b.
- LaFONTAINE, D. L. J. & TOLLERVEY, D. Ribosomal RNA. **Encyclopedia Of Life Sciences**. Nature Publishing Group / www.els.net, 2001.
- LAPPIN, M. R. Doenças Riquetsianas Polissistêmicas. IN Nelson, R. W.; Couto, C. G.: **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 2^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

- LE FLÈCHE, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L.; PRIEUR, A.; DENOEUDE, F.; RAMISSE, V.; SILVESTRE, P.; BENSON, G.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiology**, 2001a, 1:2.
- LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOEUDE, F.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; GUILLOTEAU, L. A.; VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. **BMC Microbiology**, 2006b, 6:9.
- MACEDO, E. A. Ultraestrutura de células parasitadas por *Ehrlichia* spp., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia-MG. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Saúde Animal) - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2007.
- MACHADO, R.Z. *Ehrlichiose canina*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, p. 53-57, 2004.
- MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M. F.; FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. O.; ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 44-48, 2005.
- MAGGI, R.G.; DINIZ, P.P.; CADENAS, M.B.; BREITSCHWERDET, E.B. The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. **The International Canine Vector-Borne Disease Symposium**. First Edition. Billesley, Alcester, UK. April 18th-20th, 2006.
- MARSILIO, F.; MARTINO, B.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDINI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (*gltA*) gene from various Italian strains. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 18, p. 215-217, 2006.
- MATJILA, P. T.; LEISEWITZ, A. L.; JONGEJAN, F.; PENZHORN, B. L. Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. **Vet. Parasitol.**, in press, 2008.
- MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M. P.; 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. and KYRPIDES, N. C. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 4015-4023, 2006
- MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosci. J.**, v. 21, p. 167-174, 2005.

- McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; D. GAUNT, S.D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 8, p. 441-447, 1996.
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol. 55, p. 141-147, 2003.
- MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 325-339.
- NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, p. 766-770, 2008.
- O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 94, p. 143–150, 2001.
- O'DUSHLAINE, C. T. & SHIELDS, D. C. Tools for the identification of variable and potentially variable tandem repeats. **BMC Genomics**, 2006, 7:290.
- OHASHI, N.; UNVER, A.; ZHI, N.; RIKIHISA, Y. Cloning and Characterization of Multigenes Encoding the Immunodominant 30-Kilodalton Major Outer Membrane Proteins of *Ehrlichia canis* and Application of the Recombinant Protein for Serodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2671–2680, 1998.
- OLIVE, D. M. & BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.
- PAROLA, P.; CORNET, J-P.; SANOGO, Y. O.; MILLER, R. S.; THIEN, H.; GONZALEZ, J-P.; RAOULT, D.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and Other Eubacteria in Ticks from the Thai-Myanmar Border and Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1600-1608, 2003.
- PEREZ, M.; RIKIHISA, Y. AND WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, p. 2133–2139, 1996.
- PERILLE A.L., MATUS R.E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 5, p.195–198, 1991.
- PINYOOWONG, D.; JITTAPALAPONG, S.; SUKSAWAT, F.; STICH, R.W.; THAMCHAIPENET, A. Molecular characterization of Thai Ehrlichia canis and Anaplasma platys strains detected in dogs. **Infect. Genet. Evol.** (in press), 2007.

- RIBEIRO, V.L.S., WEBER, M.A., FETZER, L.O. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, p. 285-289, 1997.
- RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 286-308, 1991a.
- RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C.; SIREGAR, A. G.; PASARIBU, F. H.; MALOLE, M. B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a Canine Granulocytic Ehrlichia Infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 143-148, 1992b.
- RODGERS, S. J.; MORTON, R. J.; BALDWIN, C. A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 1, p. 154-159, 1989.
- RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E. & D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 10, p. 13-19, 2001.
- RODRIGUES-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 75-79, 2005.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L. AND MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Vet. Journal** (article in press) 2007.
- SIARKOU, V.I; MYLONAKIS, M.E.; BOURTTZI-HATZOPOULOU, E.; KOUTINAS, A.F. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of Ehrlichia canis strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 304–312, 2007.
- SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 15, p. 13-16, 2006.
- SUKSAWAT, J., HEGARTY, B. C., BREITSCHWERDT, E. B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 14, p. 50–55, 2000a.
- SUKSAWAT, J.; PITULIE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S. I.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of the 16S ribosomal DNA secondary structure. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 90–93, 2001b.

- SZABÓ, M.P.J.; CUNHA, T.M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v. 25, p. 909-916, 2001.
- TITZE-de-ALMEIDA, R.; WILLEMS, R. J. L.; TOP, J.; RODRIGUES, I. P.; FERREIRA II, R. F.; BOELEN, H.; BRANDILEONE, M. C. C.; ZANELLA, R. C.; FELIPE, M. S. S.; VAN BELKUN, A. Multilocus variable-number tandem-repeat polymorphism among Brazilian *Enterococcus faecalis* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4879-4881, 2004.
- TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet. Parasitol.**, v. 140, p. 223-230, 2006.
- 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2788-2793, 2001.
- VAN BELKUM, A.; SCHERER, S.; ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. 1998. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 275-293, 1998.
- VENZAL, J. M.; PEÑA, A. E.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; PORTILLO, A.; OTEO, J. A. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. **Parasitol. Latinoam.**, v. 62, p. 23-26, 2007.
- VINASCO, J.; LI, O.; ALVARADO, A.; DIAZ, D. HOYOS, L.; TABACHI, L.; SIRIGIREDDY, K.; FERGUSON, C. MORO, M. H. Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 2716–2719, 2007.
- WANER, T., HARRUS, S., BARK, H., BOGIN, E., AVIDAR, Y., KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 69, p. 307–317, 1997a.
- WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A. AND 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*. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p.1–15, 2001b.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H-Y.; ZHI, N.; COUTO, G.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with Doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1852–1855, 1997a.
- WEN, B; JIAN, R.; ZHANG, Y. CHEN, R. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a New *Ehrlichia* Species Closely Related to *Ehrlichia chaffeensis* by Sequence Analyses of 16S Ribosomal DNA in *Boophilus microplus* Ticks from Tibet. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3286-3290, 2002b.

YABSLEY, M. J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON , C. N. ET AL. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Vet. Parasitol.**, v. 151, p. 279–285, 2008.

CAPÍTULO II

ARTIGO 1

OCORRÊNCIA DE *Ehrlichia canis* EM CÃES SINTOMÁTICOS DE BRASÍLIA E SUA CORRELAÇÃO COM AS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS DE ANEMIA E TROMBOCITOPENIA

Mariana de F. G. Cesar^a; Alexandra M. Greuel^a; Diego B. Xavier^a; Marta F. Vasconcelos^b; Tatiana G. Marçola^b; Laís G. Silva^b; Giane R. Paludo^{a,b}; Ricardo Titzede-Almeida^a.

^a Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília.

^b Laboratório Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília.

INTRODUÇÃO

E. canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). A doença apresenta uma distribuição mundial e atinge altas taxas de morbidade e mortalidade entre os cães domésticos (Troy & Forrester, 1990; Harrus et al., 1997a). O principal vetor da *E. canis* é o carrapato marrom dos cães, *Rhipicephalus sanguineus* (Smith et al., 1976; Lewis et al., 1977). A infecção natural progride em fases aguda, subclínica e crônica, caracterizadas por alterações clínicas e hematológicas (Waner et al., 2001; Woody et al., 1991). Os sinais clínicos da EMC são depressão, letargia, perda de peso, anorexia, febre, linfadenopatia, esplenomegalia, sinais oculares e hemorragias. Leucopenia, trombocitopenia e anemia são consideradas as principais alterações hematológicas encontradas na erliquiose (Troy and Forrester, 1990; Harrus et al., 1999b). A trombocitopenia é considerada sugestiva de EMC em áreas endêmicas, porém a identificação correta do microrganismo é necessária para o diagnóstico definitivo (Harrus et al, 1997a).

No Brasil, a EMC foi primeiramente descrita em 1973 e é considerada endêmica em vários estados (Costa, 1973; Dagnone et al., 2003; Macieira et al.,

2005; Aguiar et al., 2007; Santos et al., 2007; Carvalho et al. 2008). Entretanto, não foram relatados até o momento dados sobre a identificação do DNA de *E. canis* na região do Distrito Federal. Neste sentido, o presente estudo objetivou determinar a presença de *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, utilizando a técnica de PCR. Além disso, foi analisada a prevalência de *E. canis* em cães com anemia e trombocitopenia.

MATERIAL E MÉTODOS

População

O estudo incluiu 86 cães admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Para a análise de alterações hematológicas foram selecionadas aleatoriamente 31 animais. Os cães foram originários de diferentes regiões do Distrito federal, localizado na região Centro-Oeste do Brasil (15°, 47' S; 047°, 56' W). A região apresenta duas estações bem definidas e as amostras foram coletadas durante o período seco (Junho a Setembro de 2007; 20.9°C, 0mm³) e chuvoso (Outubro de 2007 a Março de 2008; 22.4°C, 200mm³; valores médios mensais). O critério de inclusão dos cães no estudo foi a presença de sinais clínicos sugestivos da infecção por *E. canis*, incluindo febre, depressão, letargia, perda de peso, anorexia, linfadenopatia, esplenomegalia, sinais oculares e hemorragias.

Colheita de sangue, análise hematológica e extração de DNA

Amostras de sangue foram colhidas da veia cefálica em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante. A extração de DNA das amostras foi realizada através de *kits* comerciais (QIAmp[®] DNA Blood Mini Kit, Qiagen, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, e o DNA armazenado a -20°C até a sua utilização no exame de PCR. Em um grupo de 31 amostras aleatórias, foi realizada análise hematológica com objetivo de avaliar a ocorrência de trombocitopenia, anemia e mórulas intracitoplasmáticas.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Foram utilizados os *primers* EBR1 (5'-CCTCTGGCTATAGGAAATTG- 3') e EBR5 (5'-GGAGTGCTTAACGCGTTAG- 3') para a identificação de sequências específicas do gene 16S rRNA de *E. canis* (Alves et al., 2005). Foram adicionados

os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada *primer*, 10mM Tris – HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,25µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2U de Taq platinum DNA polymerase e 10µl do DNA da amostra, em um volume total de 50µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR com 765 bp foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Análise Estatística

O programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 15 foi utilizado para analisar os dados. As diferenças de distribuição de *E. canis* de acordo com as alterações hematológicas de trombocitopenia ou de anemia foram analisadas pelo teste de Fisher. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

E. canis foi identificada em cães sintomáticos admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Este agente foi detectado em 24 (27,9%) animais de um total de 86 cães eleitos para o estudo. A técnica de PCR, utilizada para detectar sequências específicas do gene 16S rRNA de *E. canis*, produziu uma banda única e de fácil visualização (765 bp) mediante amplificação em etapa única (Alves et al., 2005) (figura 1). Este protocolo favoreceu a redução dos resultados falso-positivos devido à contaminação por *amplicons*, comumente relatados como a principal desvantagem dos métodos que utilizam a *nested-PCR*.

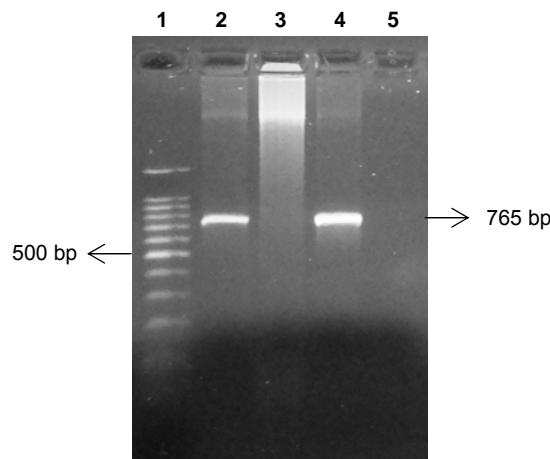


Figura 1. Resolução em gel de agarose dos produtos de PCR com *primers* EBR específicos para *E. canis*. Linha 1: marcador molecular, 100-bp; linha 2: animal positivo; linha 3: animal negativo; linha 4: controle positivo, isolado São Paulo; linha 5: controle negativo.

Embora tenham ocorrido casos positivos de erliquiose durante todo o período de análise (junho/2007 – março/2008), a doença esteve concentrada na estação chuvosa (28% versus 17%). Entretanto, essa diferença não mostrou significância estatística. As alterações hematológicas foram positivamente relacionadas à doença (tabela 1), dado que a prevalência de *E. canis* foi, respectivamente, 2,6 e 4,5 vezes superior em cães com trombocitopenia (66,7% versus 16,6%, $P < 0,05$) e anemia (56,2% versus 13,3%, $P < 0,05$).

Tabela 1. Dados hematológicos (n=31) e comparação com resultado da PCR de cães com sintomatologia clínica admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

Dados hematológicos (número)	PCR Número (%)	
	Positivo	Negativo
I. Anêmicos ^c (16)	9 (56,2) ^a	7 (43,7)
II. Não-anêmicos (15)	2 (13,3)	13 (86,6)
III. Trombocitopênicos ^c (12)	8 (66,6) ^b	4 (33,3)
IV. Não-trombocitopênicos (18)	3 (16,6)	15 (83,3)
V. Indivíduos com mórula (5)	5 (100)	Nenhum

^a $P < 0.05$ para o grupo I versus II (teste de Fisher).

^b $P < 0.05$ para o grupo III versus IV (teste de Fisher).

^c Valores de referência: Jain, 1993.

A análise dos esfregaços sanguíneos revelou a presença de mórulas em células mononucleares de cinco animais (figura 2), achado que foi totalmente correlacionado com os resultados de PCR para *E. canis*.

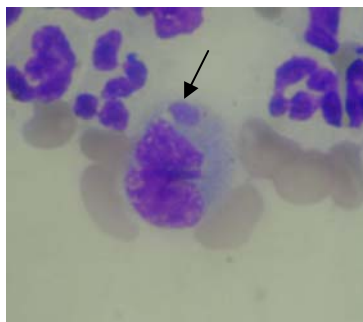


Figura 2. Mórula intracitoplasmática de *E. canis* (seta) em célula mononuclear canina.

DISCUSSÃO

O presente estudo concentrou-se na ocorrência da erliquiose monocítica canina (EMC) em uma população de cães sintomáticos de Brasília, região Centro-Oeste do Brasil. Infecções por *E. canis* foram anteriormente descritas em cidades das regiões Sul e Sudeste, incluindo Londrina, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Jaboticabal e Botucatu (Costa, 1973; Dagnone et al., 2003; Bulla et al., 2004; Santos et al., 2007; Nakaghi et al., 2008). A doença também foi relatada em cães das regiões Norte e Nordeste, nos estados de Rondônia e na Bahia, respectivamente (Aguilar et al., 2007; Carvalho et al. 2008).

A cidade de Brasília apresenta condições de temperatura e umidade que favorecem o desenvolvimento do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*, particularmente durante a estação chuvosa (Smith et al., 1976; Labruna, 2004). A prevalência de *E. canis* no atual estudo (27,9%) foi similar àquela encontrada em outras cidades, como Botucatu, área endêmica para erliquiose. A cidade de Botucatu, localizada no interior de São Paulo, também possui condições climáticas satisfatórias para o desenvolvimento do vetor, determinando-se a prevalência do agente da EMC discretamente mais elevada (30,9%) (Bulla et al., 2004). Por outro lado, na cidade de Londrina, região Sul do Brasil, cães demonstrando sinais clínicos de EMC ou fortemente infestados por carrapatos, apresentaram taxas menores de prevalência (21,7%) (Dagnone et al., 2003). Em cães do Rio de Janeiro e Bahia, a prevalência de *E. canis* também foi menor comparada aos resultados do presente

estudo (15% e 7,8% respectivamente). Entretanto, nenhum critério clínico ou hematológico foi aplicado para eleger os indivíduos sujeitos ao estudo naquelas regiões, fatores que influenciam as taxas de prevalência (Macieira et al., 2005; Carvalho et al., 2008).

O curso da infecção por *E. canis* é comumente associado a alterações hematológicas, particularmente a trombocitopenia e anemia (Troy and Forrester, 1990; Almosny, 1998). Em Jaboticabal, constatou-se uma alta prevalência de *E. canis* (53,3%) na população de cães com sinais clínicos e hematológicos de erliquiose (Nakaghi et al., 2008). De modo similar, altas taxas de prevalência foram encontradas em cães trombocitopênicos de Ribeirão Preto (66,3%) e Botucatu (45,2%), corroborando os resultados do atual estudo (66,6%) (Bulla et al., 2004; Santos et al., 2007). Entretanto, a prevalência de *E. canis* em cães com trombocitopenia nas cidades de Londrina e Rio de Janeiro foi relativamente inferior (19,7% e 26,8%, respectivamente).

As discrepâncias encontradas podem refletir as diferenças nos fatores que afetam o desenvolvimento da doença, incluindo a prevalência da erliquiose em determinada região, a população canina sob investigação, o método diagnóstico e o critério de inclusão (Wen et al., 1997a; Dagnone et al, 2003; Macieira et al, 2005; Carvalho et al., 2008). Outras doenças também devem ser consideradas para o diagnóstico, inclusive em áreas endêmicas para erliquiose. Infecções causadas por microrganismos do gênero *Babesia*, *Bartonella* e *Anaplasma*, bem como doenças neoplásicas, doenças imuno-mediadas e processos inflamatórios são exemplos de distúrbios que podem causar trombocitopenia (Grindem et al., 2002). Além disto, a infecção por *E. canis* pode ocorrer na ausência de trombocitopenia. Estudos prévios em diferentes cidades mostram valores variáveis de prevalência da erliquiose em cães não-trombocitopênicos, fato observado em Botucatu, Rio de Janeiro e Ribeirão Preto (1,4%, 3,5%, e 33,7%, respectivamente), assim como em Brasília (16,6%). Em conjunto, estes achados reforçam a importância de considerar a possibilidade de infecção por *E. canis*, mesmo na ausência de alterações hematológicas sugestivas da doença.

Outro achado hematológico comumente associado à erliquiose é a anemia (Almosny, 1998). No presente estudo, também foi encontrada correlação positiva entre a presença de *E. canis* e a anemia (52,6%). O resultado corrobora dados obtidos no Rio de Janeiro e em Jaboticabal, relacionados à prevalência de *E. canis*

em cães anêmicos (58,3% e 76,9%, respectivamente) (Macieira et al., 2005; Nakaghi et al., 2008). Na cidade de Londrina, a prevalência de *E. canis* em cães anêmicos foi relativamente menor (21,1%) (Dagnone et al., 2003).

A análise dos esfregaços sanguíneos revelou a presença de mórulas em células mononucleares de cinco animais (16,1%), fato também relatado em estudos realizados no Rio de Janeiro (15%) e em Jaboticabal (3,3%) (Macieira et al., 2005; Nakaghi et al., 2008). A presença de mórulas foi totalmente correlacionada aos resultados positivos do teste de PCR para *E. canis* no atual estudo. Embora este achado seja altamente conclusivo para o diagnóstico de erliquiose, o método apresenta pouca sensibilidade devido à baixa incidência de mórulas em casos positivos da doença (Elias, 1991).

CONCLUSÕES

O presente estudo identificou a infecção por *E. canis* em cães residentes em Brasília, região Centro-Oeste do Brasil. A ocorrência do microrganismo foi superior na estação chuvosa (Outubro-Março), embora casos positivos tenham ocorrido ao longo de todo o período analisado (junho/2007 – março/2008). Os resultados indicam que a região onde está localizada a cidade de Brasília seja considerada área endêmica para a EMC.

A alta prevalência de *E. canis* em cães trombocitopênicos e anêmicos não exclui a necessidade da pesquisa do microrganismo na ocorrência destas alterações hematológicas. Além disso, a investigação de outros agentes infecciosos, neoplasias ou doenças imuno-mediadas se faz necessária para um diagnóstico definitivo da doença, dado a ocorrência de coinfeções ou outros processos que cursam com as mesmas alterações hematológicas.

A detecção do DNA de *E. canis* em cães que não apresentavam trombocitopenia ou anemia sugere a necessidade de pesquisa de *E. canis*, em animais com alguma sintomatologia clínica, mesmo na ausência de alterações hematológicas típicas da erliquiose.

REFERÊNCIAS

- 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. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p.126-132, 2007.
- ALMOSNY, N.R.P., 1998. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): Avaliação Parasitológica, Hematológica e Bioquímica Sérica da Fase Aguda de Cães e Gatos Experimentalmente Infectados. **Ph.D. Thesis**. Faculdade de Medicina Veterinária, Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil.
- ALVES, L.M., LINHARES, G.F.C., CHAVES, N.S.T., MONTEIRO, L.C., LINHARES, D.C.L. Avaliação de Iniciadores e Protocolo para o Diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. v. 6, p. 49-54, 2005.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO JR., J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S. AND WIEDMEYER, C.E.. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, v.35, p. 141–146, 2004.
- CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; CARLOS, R.S.A. AND ALBUQUERQUE G.R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genet. Mol. Res**. v. 7, p. 657-662, 2008.
- COSTA, J.O. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos Escola Veterinária, UFMG**. v. 25, p.199–200, 1973.
- DAGNONE, A.S.; DE MORAIS, H.A.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F.S. AND VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 117, p. 285–290, 2003.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies of morulae of *E. canis*. **J. Small. Anim. Pract.**, v. 33, p. 540–543, 1991.
- GRINDEM, C. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; CORBETT, W. T. AND JANS, H. E. Epidemiologic Survey of Thrombocytopenia in Dogs: A Report on 987 Cases. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 20, p. 38–43, 1991.
- HARRUS, S.; BARK, H. AND WANER, T. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update, **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v. 19, p. 431–441, 1997a..
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F. AND CORNELISSEN, A. W. C. A. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2745–2749, 1999b.
- JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1^a ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 417 p, 1993.

- LABRUNA, M. B. Biologica-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v. 13, p. 123-124, 2004.
- LEWIS, G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T. AND STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 38, p.1953-1955, 1977.
- MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M. F.; FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. O. AND ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 44–48, 2005.
- NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R. AND BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Cienc. Rural.**, v. 38, p. 766-770, 2008.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L. AND MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Vet. Journal** (article in press), 2007.
- SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M. R. AND HUXSOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia, **Am. J. Vet. Res.**, v. 37, p. 119–126, 1976.
- TROY, G. C. AND FORRESTER, S. D. **Canine Ehrlichiosis** in: Greene C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, WB Saunders Co, Philadelphia, 404–414 p, 1990.
- WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A. AND 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*. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p.1–15, 2001.
- WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A. AND BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1852–1855, 1997.
- WOODY, B. J. AND HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.**, v. 21, p.75–98, 1991.

ARTIGO 2

ANÁLISE DE VARIABILIDADE EM REGIÕES GENÔMICAS DE REPETIÇÃO DE *Ehrlichia canis*.

Mariana de F. G. Cesar^a; Diego B. Xavier^a; Giane R. Paludo^{a,b}; Ricardo Titze-de-Almeida^a.

^a Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília.

^b Laboratório Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília.

INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina, doença infecciosa que acomete cães domésticos e selvagens. Evidências sorológicas e/ou moleculares da infecção são descritas em todas as regiões do Brasil e em países do sul da Europa, África, Ásia e América, onde condições climáticas e ambientais favorecem o estabelecimento do carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, principal vetor da *E. canis* (Dagnone et al., 2001; Aguiar et al., 2007).

O desenvolvimento de métodos diagnósticos seguros, baseados em técnicas sorológicas e moleculares, assim como o desenvolvimento de vacinas eficazes para erliquiose depende de uma compreensão da diversidade genética de *E. canis*. A caracterização molecular de genes evolutivamente conservados, como o 16S rRNA, tem prestado pouca informação sobre a diversidade de cada cepa, pois sugere um elevado nível de conservação. Da mesma forma, outros genes como o tio-oxidoredutase (*dsb*), *gltA* e *p28/30* também apresentam-se altamente conservados em cepas geograficamente dispersas (Zhang et al., 2008).

Seqüências bem conservadas do genoma de microrganismos são comumente utilizadas em estudos filogenéticos e como alvos gênero-específico ou espécie-específico para diagnóstico molecular. No entanto, tais regiões não apresentam variabilidade significativa entre os indivíduos da mesma espécie, não permitindo a

classificação de diferentes isolados em subtipos ou cepas (Olive & Bean, 1999). Recentemente, métodos de tipagem baseados na análise de regiões genômicas de repetição (*variable number of tandem repeats* - VNTR) têm fornecido uma metodologia simples e de alta resolução para discriminação de isolados (Chang et al., 2007). As regiões de VNTR consistem em seqüências de nucleotídeos que se repetem em bloco, e podem apresentar variação no número de repetições. Mediante a técnica de PCR, o polimorfismo destas regiões é identificado pelo tamanho dos *amplicons*, facilmente visualizados por eletroforese em gel de agarose. A análise de VNTRs, devido à sua natureza multi-alélica e diferenças no número de repetições, tem permitido uma discriminação adequada mesmo entre isolados com proximidade genética e, sua utilização como método de tipagem microbiana já foi descrita para várias espécies, incluindo *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Xylella fastidiosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp., *Burkholderia pseudomallei* e *Neisseria meningitides* (Le Flèche et al., 2001a; Denoeud & Vergnaud, 2003; Titze-de-Almeida et al., 2004; Flèche et al., 2006b; Chang et al., 2007; U'Ren et al., 2007;).

Neste sentido, a investigação de regiões no genoma de *E. canis* que apresentem um nível de divergência intra-espécie torna-se necessária para a identificação de marcadores moleculares específicos para a tipagem microbiana. Estudos prévios mostraram variação no número de repetições de uma glicoproteína de superfície da *E. canis*, que contém região de repetições em *tandem*, a GP36 (Doyle et., 2006b). O recente sequenciamento do genoma completo de *E. canis* (Mavromatis et al., 2006) revelou um pequeno grupo de genes (n=12) que codificam proteínas contendo repetição em *tandem*, incluindo as proteínas imunogênicas GP36 e GP140. Zhang et al. (2008) observaram variabilidade no número de repetições das duas glicoproteínas, GP36 e GP140, entre isolados do Brasil, EUA e Israel. O presente trabalho investigou seis regiões genômicas de repetição de *E. canis*, visando identificar possíveis marcadores moleculares para tipagem do microrganismo. A detecção de variabilidade no número de repetições destas regiões foi realizada utilizando-se a técnica de PCR. Estudos de diversidade genética em isolados de *E. canis* contribuem para a caracterização epidemiológica do microrganismo, podendo indicar diferenças de patogenicidade, virulência e

resistência microbiana entre diferentes genótipos, além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas eficazes.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados controle de *E. canis* de regiões do Brasil e dos Estados Unidos

Onze isolados de *E. canis*, cultivados em células de linhagem originária de histiocitoma canino – DH82, foram gentilmente cedidos ao laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília. Nove isolados pertencem a sete diferentes localidades do Brasil: São Paulo (SP – n=2), Jaboticabal (SP), Presidente Prudente (SP), Cuiabá (MT), Belém (PA), Monte Negro (RO - n=2) e Londrina (PR) (figura 1). Outros dois isolados - Jake e Oklahoma - são originários dos Estados Unidos. O isolado Jake foi utilizado como cepa controle de referência, pois tem seu genoma completamente seqüenciado, servindo de molde para o desenho de *primers* de cada região de repetição, assim como controle de amplificação das regiões genômicas de repetição selecionadas. Este conjunto de isolados controle (n=11) provenientes de regiões geograficamente distintas foi utilizado para teste das seis regiões de repetição selecionadas, ecaj_0017, ecaj_0062, ecaj_0109, ecaj_0221, ecaj_0472 e ecaj_0530, conforme descrito a seguir.

Linhagens de *E. canis* obtidas na cidade de Brasília

O presente estudo avaliou a variabilidade no número de repetições da região de VNTR da glicoproteína GP36 (ecaj_0109) em linhagens de *E. canis* obtidas de amostras de sangue total de cães sintomáticos (n=34), admitidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Os animais incluídos no estudo apresentaram sintomas da doença e diagnóstico de EMC confirmado pela identificação da espécie *E. canis* por PCR, conforme descrito a seguir. A extração de DNA das amostras foi realizada através de *kits* comerciais (QIAmp[®] DNA Blood Mini Kit, Qiagen, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Regiões genômicas de repetição em *tandem*

Regiões do genoma de *E. canis*, citadas por Mavromatis et al. (2006), contendo repetições em *tandem* foram identificadas mediante análise do genoma do

isolado Jake de *E. canis*, depositado no *GenBank* sob número de acesso CP000107. As seqüências de cada gene foram submetidas ao programa *Tandem repeats finder* (Benson, 1999) para a obtenção das regiões de repetição em *tandem*. Com base nesta análise, foram selecionados mais quatro genes para investigação de variabilidade nas regiões de repetição (ecaj_0062, ecaj_0221, ecaj_0472 e ecaj_0530), considerando-se o tamanho das repetições, além dos genes Ecaj_0109 e ecaj_0017 que codificam respectivamente a glicoproteína GP36 e GP140.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

1. Identificação da espécie *E. canis*

A detecção de *E. canis* a partir de amostras sanguíneas de cães foi realizada por PCR, utilizando-se os primers EBR1 (5'-CCTCTGGCTATAGGAAATTG- 3') e EBR5 (5'-GGAGTGCTTAACGCGTTAG- 3'), que identificam seqüências específicas do gene 16S rRNA (Alves et al., 2005). Foram adicionados os seguintes componentes à mistura de PCR: 10pmol de cada primer, 10mM Tris – HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,25µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2U de Taq platinum DNA polymerase e 10µl do DNA da amostra, em um volume total de 50µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

2. Identificação de regiões genômicas de repetição

Os primers utilizados no atual estudo foram desenhados conforme critérios previamente estabelecidos (Florida State University, 2000), visando-se obter uma combinação de oligonucleotídeos específicos para a amplificação da região contendo as repetições em tandem de cada um dos genes selecionados. Os primers foram submetidos ao programa Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calc) para a definição da temperatura de anelamento e investigação de estruturas secundárias internas não desejáveis, como grampos e/ou dímeros. Para a confirmação da identidade, as seqüências dos primers foram submetidas a avaliações, on-line, junto ao banco de dados do GenBank, através da operação denominada BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Aquelas que geraram resultados satisfatórios foram utilizadas para a síntese dos primers, realizada por empresa especializada. Os genes selecionados, os primers de cada região, a

respectiva temperatura de anelamento e o tamanho esperado do produto da PCR, delimitado pelos primers tendo como referência o genoma do isolado Jake (CP000107, GenBank), constam na tabela 1. Padronizou-se a seguinte mistura de reagentes da PCR para a amplificação da região que delimita as repetições de cada gene: 20pmol de cada primer, 10mM Tris – HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,25µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,2U de Taq platinum DNA polymerase e 10µl do DNA da amostra, em um volume total de 50µl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento conforme primer utilizado (ver tabela 1) por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos da PCR (amplicons) foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Tabela 1 – Genes selecionados para análise de variabilidade, seqüências do *primers* (*forward* e *reverse*), temperatura de anelamento e tamanho da região amplificada na cepa Jake de *E. canis*

Região de repetição	Primers	Temperatura de anelamento (ciclo PCR)	Tamanho do amplicom na cepa Jake
ecaj_0017 (GP140)	F: GTG ACT ACA TCA AGT ACG CAA G R: TGA TAC AGG ACA ACA CAT TTC ATC	58°C	1865 bp
ecaj_0109 (GP36)	F: GTT AAT AAC CAT CCT AAC TTC TTT A R: AAA CTC AAG TCC AGT GTT GTG A	53°C	318bp
ecaj_0062	F: GGT GTT AGG TTG AAA AGC GAG R: ACT AAC TAA CTC TAC CTG AGC	53°C	783 bp
ecaj_0221	F: GGC ATA GAT GGC AAT ACA CA R: TTC TGT GCA TAT TAC CAC ACC	53°C	463 bp
ecaj_0472	F: CAC TGT CCT TCG GCT GAG AT R: TGC CTG ATA CAA TGC GTG AT	53°C	1152 bp
ecaj_530	F: CCC CAA CAT CAG GTG TCT CT R: TCC GAG AAG TCA CAG TGG TG	58°C	968 bp

RESULTADOS

O presente estudo identificou variabilidade genética em regiões de repetição de *E. canis* de isolados controle e nas linhagens obtidas na cidade de Brasília. O grau de polimorfismo variou de acordo com o marcador molecular utilizado, identificando-se regiões de repetição sem variabilidade genética (tabela 2). Todas as regiões de repetição apresentaram o produto de amplificação (*amplicon*) esperado para a cepa controle de referência Jake, comprovando a especificidade de cada *primer*.

Regiões de repetição com variabilidade alélica identificadas em isolados controle de *E. canis*

Foi identificada variabilidade genética em três regiões de repetição: ecaj_0109, ecaj_0017 e ecaj_0221.

O gene ecaj_0109 codifica a glicoproteína de superfície GP36 de *E. canis*, cuja variabilidade foi previamente descrita por Doyle et al. (2006b). No presente estudo também verificou-se diferenças no número de repetições da GP36 entre os isolados controle, identificando-se alelos com 5, 6 e 18 repetições (figura 2). Os isolados Jaboticabal, Monte Negro e Belém não apresentaram amplificação, e foram considerados contendo zero repetições (tabela 2).

Quanto ao gene ecaj_0017, este codifica a glicoproteína de superfície GP140 da *E. canis*, que mostrou variabilidade em isolados dos EUA, Brasil e Israel (Zhang et al., 2008). O atual estudo também identificou variabilidade nesta região, com alelos contendo 12 e 14 repetições (tabela 2).

O gene ecaj_0221 codifica uma proteína que contém um domínio ankyrin. Proteínas contendo domínios ankyrin são responsáveis por mediar interações entre proteínas, porém a função da ecaj_0221 não foi determinada. No atual estudo, identificou-se variabilidade nos isolados controle, havendo amplificação de produtos contendo uma ou duas repetições (tabela 2).

A localização dos isolados brasileiros de diferentes regiões geográficas com variabilidade alélica identificada nas três regiões de repetição ecaj_0109, ecaj_0017 e ecaj_0221, pode ser observada na figura 1.

Figura 1. Mapa situando as diferentes regiões geográficas dos isolados controle brasileiros com legenda das respectivas variações no número de unidades repetitivas das regiões de repetição com variabilidade alélica (ecaj_0109, ecaj_0017 e ecaj_0221).



- **Belém:** ecaj_109 – 0 repetições; ecaj_0017 – 12 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
- **Monte Negro:** nº 15 - ecaj_109 – 0 repetições; ecaj_0017 – 12 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
nº 24 - ecaj_109 – 0 repetições; ecaj_0017 – 12 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
- **Cuiabá:** ecaj_109 – 5 repetições; ecaj_0017 – 14 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
- **Jaboticabal:** ecaj_109 – 0 repetições; ecaj_0017 – 12 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
- **Presidente Prudente:** ecaj_109 – 6 repetições; ecaj_0017 – 14 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
- **São Paulo:** nº 1 - ecaj_109 – 6 repetições; ecaj_0017 – 14 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
nº 2 - ecaj_109 – 18 repetições; ecaj_0017 – 14 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição
- **Londrina:** ecaj_109 – 6 repetições; ecaj_0017 – 12 repetições; ecaj_0221 – 1 repetição

Regiões de repetição sem variabilidade alélica identificadas em isolados controle de *E. canis*

O presente estudo identificou ausência de variabilidade genética em três regiões de repetição dos isolados controle, ecaj_0062, ecaj_0472 e ecaj_0530.

O gene ecaj_0062 codifica uma “proteína hipotética” da *E. canis*, cuja função ainda não foi descrita na literatura. Neste estudo, foi possível identificar um produto de PCR de tamanho idêntico, correspondente a 3 blocos de repetição, evidenciando que esta região de repetição não apresenta polimorfismo entre os isolados controle testados (tabela 2). O tamanho deste produto de PCR corresponde àquele da seqüência descrita no GenBank para a cepa controle Jake, mostrando a especificidade da amplificação.

Quanto ao gene ecaj_0472, o mesmo codifica uma “proteína hipotética” da *E. canis*, cuja função ainda não foi descrita. Para este gene, também não foi evidenciada variabilidade genética. Identificou-se um produto de PCR que corresponde a 13 blocos de repetições. O tamanho do *amplicon* corresponde ao descrito para esta região na da cepa controle Jake (Tabela 2).

O gene ecaj_0530 codifica a *TrbL/VirB6 plasmid conjugal transfer protein* da *E. canis*. Genes que codificam proteínas *VirB* tem sido associados com a secreção de toxinas e a existência intracelular; no entanto, a função específica da ecaj_0530 ainda não foi determinada. Os produtos de PCR apresentaram tamanho idêntico, correspondendo a 8 unidades repetitivas. O resultado indica ausência de variabilidade genética nesta região de repetição entre os isolados controle (tabela 2, figura 2 - C).

Tabela 2. Número de unidades repetitivas das regiões genômicas de repetição em *tandem* em isolados controle de *E. canis*.

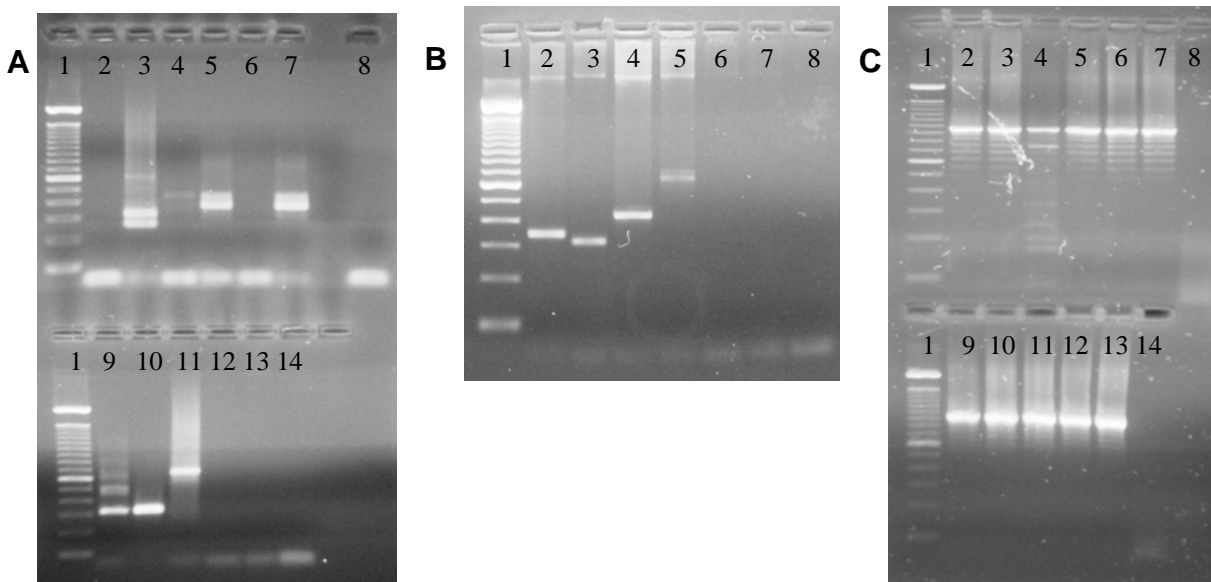
Isolados*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Região de repetição	Número estimado de unidades repetitivas										
ecaj_0109	0	5	6	6	0	6	5	5	18	0	0
ecaj_0017	12	14	14	14	12	12	14	14	14	12	12
ecaj_0221	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
ecaj_0062	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ecaj_0472	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
ecaj_0530	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

*Isolados: 1-Jaboticabal; 2-Cuiabá; 3-São Paulo (número 1); 4-Presidente Prudente; 5-Monte Negro (número 24); 6-Londrina; 7-Jake (cepa de referência); 8-Oklahoma; 9- São Paulo (número 2), 10-Belém e 11-Monte Negro (número 15).

Variabilidade de ecaj_109 (GP36) em linhagens de *E. canis* identificadas em cães da cidade de Brasília

O grau de polimorfismo genético na região de repetição da GP36 observado entre os isolados controle de *E. canis* estimulou a análise de variabilidade desta região em amostras de sangue positivas para *E. canis*, obtidas na cidade de Brasília. Os resultados de variabilidade da GP36 de trinta e quatro amostras sanguíneas positivas para *E. canis* mostram o maior grau de polimorfismo em relação às demais regiões testadas, apresentando alelos com 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18 e 21 unidades de repetição (tabela 3; figura 2). Os alelos contendo 9, 14, 15, 17 e 21 repetições estão sendo descritos pela primeira vez no presente estudo. Dezesesseis amostras não apresentaram amplificação e foram consideradas contendo zero repetições. A tabela 4 mostra a frequência do número de unidades repetitivas encontradas em todos os isolados (n=11) e amostras sanguíneas (n=34) testadas para a região de repetição da GP36. O gel de agarose representativo dos resultados obtidos na análise desta região pode ser observado na figura 2 - A e B.

Figura 2. Resolução em gel de agarose dos produtos de PCR com *primers* específicos das regiões genômicas de repetição em *tandem* de *E. canis*.



A: GP36 (isolados controle) 1-Ladder 100bp; 2-Jaboticabal; 3-Cuiabá; 4-São Paulo (número 1); 5-Presidente Prudente; 6-Monte Negro (número 24); 7-Londrina; 8- controle negativo; 9-Jake (cepa de referência); 10-Oklahoma; 11- São Paulo (número 2), 12-Belém; 13-Monte Negro (número 15) e 14- controle negativo. **B: GP36** (linhagens de *E. canis* de cães de Brasília) 1-Ladder 100bp; 2-linhagem com 6 repetições; 3-linhagem com 5 repetições; 4-linhagem com 9 repetições; 5-linhagem com 18 repetições; 6-linhagem com 0 repetições; 7-amostra de cão negativo para DNA de *E. canis* e 8-controle negativo. **C: ecaj_0530** (isolados controle com o mesmo número de 8 repetições) 1-Ladder 100bp; 2-Jaboticabal; 3-Cuiabá; 4-São Paulo (número 1); 5-Presidente Prudente; 6-Monte Negro (número 24); 7-Londrina; 8- controle negativo; 9-Jake (cepa de referência); 10-Oklahoma; 11- São Paulo (número 2), 12-Belém; 13-Monte Negro (número 15) e 14- controle negativo.

Tabela 3 - Número de unidades repetitivas da região de repetição em *tandem* da GP36 em linhagens de *E. canis* em cães de Brasília.

Número da amostra	Nº de unidades repetitivas	Tamanho do <i>amplicom</i> (bp)
1	18	669
2	9	426
3	18	669
4	18	669
5	0	0
6	6	345
7	5	318
8	9	426
9	14	561
10	17	642
11	10	453
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	17	642
23	0	0
24	15	588
25	17	642
26	0	0
27	0	0
28	0	0
29	0	0
30	14	561
31	9	426
32	21	750
33	16	615
34	7	372

Tabela 4 – Freqüência do número unidades repetitivas da região de repetição em *tandem* da GP36 em isolados controle do Brasil e EUA e linhagens de *E. canis* obtidas em cães de Brasília.

Número de repetições	Isolados e amostras sanguíneas	Tamanho do <i>amplicom</i> (bp)
5	4	318
6	4	345
7	1	372
9	3	426
10	1	453
14	2	561
15	1	588
16	1	615
17	3	642
18	4	669
21	1	750
0	20	
Total de amostras	45	

DISCUSSÃO

E. canis é a espécie de *Ehrlichia* com maior distribuição geográfica, ocorrendo em países da Ásia, Europa, África e América (Rodgers et al., 1989; Keysary et al., 1996a; Unver et al., 2001; Parola et al., 2003; Rodrigues-Vivas et al., 2004; Marsilio et al., 2006; Pinyoowong et al., 2007; Venzal et al., 2007; Matijila et al., 2008). No Brasil, a infecção em cães por *E. canis* já foi descrita em São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Bahia e em outros estados do país (Dagnone et al., 2001; Moreira et al., 2003; Bulla et al., 2004; Machado, 2004; Alves et al., 2005; Macieira et al., 2005; Aguiar et al., 2007a; Labruna et al., 2007; Santos et al., 2007; Carvalho et al. 2008). No entanto, apesar da ampla ocorrência da *E. canis*, poucos estudos avaliaram a diversidade genética desta população microbiana.

Estudos prévios com alguns genes, incluindo o 16S rRNA, *dsb*, *gltA* e p28/30, mostraram alto nível de conservação entre cepas geograficamente dispersas. Entretanto, recentemente foi identificada variabilidade genética em regiões

genômicas de repetição dos genes que expressam a GP36 e a GP140 de *E. canis* (Doyle et al., 2005a; Doyle et al., 2006b; Zhang et al., 2008) o que estimulou a realização deste estudo.

O presente estudo identificou variabilidade na região de repetição da GP36 (ecaj_0109) em uma amostra formada por isolados controle de *E. canis* (n=11) e por amostras de sangue positivas do Distrito Federal (n=34). Deste total (n=45), vinte e cinco amostras demonstraram variabilidade de 5 a 21 repetições. Amostras contendo 5, 6 e 18 repetições foram mais freqüentes, enquanto 7, 10, 15, 16 e 21 repetições apareceram em amostras únicas (tabela 4). A ampla variação alélica da GP36, inclusive entre isolados de uma mesma região geográfica, sugere que esta região seja alvo de pressão seletiva ambiental. Uma vez que GP36 é uma glicoproteína de superfície da *E. canis* (Mavromatis et al., 2006), sua localização favorece a pressão seletiva para adaptação da bactéria ao ambiente intracelular. No entanto, 20 amostras não apresentaram amplificação da região de repetição da GP36. Representantes do gênero *Ehrlichia* são observadas em duas formas morfológicas distintas, conhecidas como forma reticuladas e denso-coradas. Doyle et al. (2006b) observaram que a expressão da GP36 ocorre somente na superfície das formas denso-coradas da bactéria. Outras possíveis explicações para a falta de amplificação seriam a ausência do gene ou mutações na região de anelamento dos *primers*. A amplificação das regiões intergênicas do gene da GP36 poderia ajudar a elucidar a questão, sendo necessários estudos futuros desta região. Entretanto, a diversidade genética da GP36 encontrada entre as amostras analisadas neste estudo e também observada em diferentes isolados de *E. canis* em outros trabalhos (Doyle et al., 2005a; Doyle et al., 2006b; Zhang et al., 2008), sustentam a utilização deste gene como possível alvo molecular para estudos de genotipagem de *E. canis*. Porém, a utilização da GP36 para desenvolvimento de vacinas, devido a sua capacidade imunogênica, ou fins diagnóstico, deve ser cuidadosamente avaliada.

A glicoproteína de superfície GP140, codificada pelo gene ecaj_0017, também apresentou variação no número de unidades repetitivas nos isolados testados. Assim como a GP36, a GP140 pertence ao um grupo de proteínas de superfície imunogênicas de *E. canis*. No entanto, foi observado um grau menor de variabilidade entre os isolados. Os isolados Jake, Oklahoma, São Paulo número 1, São Paulo número 2, Presidente Prudente e Cuiabá apresentaram 14 repetições, enquanto Jaboticabal, Monte Negro número 15, Monte Negro número 24, Londrina e

Belém tiveram duas repetições a menos. Variabilidade alélica na GP140 foi também observada por Zhang et al. (2008) entre os isolados do EUA e Brasil (14 repetições) e Israel (12 repetições); segundo o autor, as diferenças no número de repetições podem estar associadas a diferenças na patogenicidade do microrganismo.

O gene *ecaj_0221* codifica uma proteína que contém um domínio *ankyrin*. Proteínas contendo domínios *ankyrin* são responsáveis por mediar interações entre proteínas, porém a função da *ecaj_0221* ainda não foi determinada. A variação do número de repetições desta região foi observada entre os isolados do Brasil e dos EUA. Os isolados brasileiros (São Paulo número 1, São Paulo número 2, Presidente Prudente, Cuiabá, Jaboticabal, Monte Negro número 15, Monte Negro número 24, Londrina e Belém) apresentaram uma unidade repetitiva enquanto isolados dos EUA (Jake e Oklahoma) tiveram duas repetições (tabela 2), evidenciando-se a diversidade entre isolados oriundos das duas áreas geográficas.

Em relação às outras três regiões genômicas de repetição (*ecaj_0062*, *ecaj_0472* e *ecaj_0530*) não foram observadas diferenças no número de repetição nos isolados testados. O gene *ecaj_0530* codifica a *TrbL/VirB6 plasmid conjugal transfer protein* da *E. canis*, cuja amplificação da região de repetição mostrou um produto de 968 bp (figura 2 - C). Genes que codificam proteínas *VirB* tem sido associados com a secreção de toxinas e a existência intracelular. No entanto, a função da *ecaj_0530* não foi determinada. Os genes *ecaj_0062* e *ecaj_0472* codificam “proteínas hipotéticas” da *E. canis*, não existindo até o presente momento nenhuma evidência do papel funcional destas proteínas. As amplificações ocorridas em todos os isolados, nas duas regiões, correspondem ao número esperado de repetições, tendo como referência o isolado Jake. Foram observados produtos de 783 bp e 1152 bp para a *ecaj_0062* e *ecaj_0472*, respectivamente.

A ausência de variação no número de unidades repetitivas dos genes *ecaj_0062*, *ecaj_0472* e *ecaj_0530* em todos os isolados testados sugere que não ocorra variabilidade destas regiões em *E. canis*. Entretanto, é recomendável que um número superior de amostras seja testado para confirmar esta hipótese.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a ocorrência de variabilidade entre os isolados do Brasil e EUA, em três regiões genômicas de repetição da *E. canis*. A variabilidade alélica identificada em diferentes loci do genoma sugere a existência de linhagens de *E. canis* geneticamente distintas no Brasil. Além disto, os resultados indicam que tais regiões possam ser utilizadas como marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética do microrganismo. Estes achados, aliados a existência de outras regiões de repetição em *tandem* no genoma da bactéria, estimulam futuros estudos para a identificação de novos alvos moleculares, com o objetivo de padronizar um método de tipagem de *E. canis* baseado em regiões de repetição.

REFERÊNCIAS

- 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. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p. 126-132, 2007.
- ALVES, L. M. ; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 49-54, 2005.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 537-580, 1999.
- BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR., J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WEIDMEYER, D.C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, v. 35, p. 141-146, 2004.
- CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; CARLOS, R.S.A. AND ALBUQUERQUE G.R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 7, p. 657-662, 2008.
- CHANG, CHIA-HUNG; CHANG, YU-CHUNG; UNDERWOOD, A.; CHIOU, CHIEN-SHUN; KAO, CHENG-YAN. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 416-421, 2007.

- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, M.C. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, v. 22, p.191-201, 2001.
- DENOEUDE, F. & VERGNAUD, G. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. **BMC Bioinformatics**, 2004, 5:4.
- DOYLE, C.K.; CARDENAS, A.M.; AGUIAR, D.M.; LABRUNA, M.B.; NDIP, L.M.; YU, XUE-JIE; MCBRIDE, J.W. Molecular Characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 Tandem Repeats among Isolates from Different Geographic Locations. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1063, p. 433–435, 2005a.
- DOYLE, C.K.; NETHERY, K.A.; POPOV, V.L.; MCBRIDE, J.W. Differentially Expressed and Secreted Major Immunoreactive Protein Orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* Elicit Early Antibody Responses to Epitopes on Glycosylated Tandem Repeats. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 711-720, 2006b.
- KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C.K.; DAWSON, J.E.; ZASS, R.; BIGGIE, K.L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel., **Vet. Parasitol.**, v. 62, p. 331-340, 1996.
- 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. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 189-195, 2007.
- LE FLÈCHE, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L.; PRIEUR, A.; DENOEUDE, F.; RAMISSE, V.; SILVESTRE, P.; BENSON, G.; RAMISSE, F., VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiology**, 2001a, 1:2.
- LE FLÈCHE, P; JACQUES, I; GRAYON, M; DAHOUK, S; BOUCHON, P; DENOEUDE, F; NÖCKLER, K; NEUBAUER, H; GUILLOTEAU, L. A; VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. **BMC Microbiology**, 2006b, 6:9.
- MACHADO, R.Z. *Ehrlichiose canina*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, p. 53-57, 2004.
- MACIEIRA, D. B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. M. F.; FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. O.; ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 44-48, 2005.
- MARSILIO, F.; MARTINO, B.; MERIDIANI, I.; BIANCIARDINI, P. Direct identification of *Ehrlichia canis* by a novel polymerase chain reaction method and molecular

- analysis of the citrate synthase (*gltA*) gene from various Italian strains. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 18, p. 215-217, 2006.
- MATJILA, P. T.; LEISEWITZ, A. L.; JONGEJAN, F.; PENZHORN, B. L. Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. **Vet. Parasitol.**, in press, 2008.
- MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M. P.; 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. and KYRPIDES, N. C. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 4015-4023, 2006
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol. 55, p. 141-147, 2003.
- OLIVE, D. M. & BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.
- PAROLA, P.; CORNET, J-P.; SANOGO, Y. O.; MILLER, R. S.; THIEN, H.; GONZALEZ, J-P.; RAOULT, D.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and Other Eubacteria in Ticks from the Thai-Myanmar Border and Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1600-1608, 2003.
- PINYOOWONG, D.; JITTAPALAPONG, S.; SUKSAWAT, F.; STICH, R.W.; THAMCHAIPENET, A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infect. Genet. Evol.** (in press), 2007.
- RODGERS, S. J.; MORTON, R. J.; BALDWIN, C. A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 1, p. 154-159, 1989.
- RODRIGUES-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 75-79, 2005.
- SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L. AND MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Vet. Journal** (article in press) 2007.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R.; WILLEMS, R. J. L.; TOP, J.; RODRIGUES, I. P.; FERREIRA II, R. F.; BOELEN, H.; BRANDILEONE, M. C. C.; ZANELLA, R. C.; FELIPE, M. S. S.; VAN BELKUN, A. Multilocus variable-number tandem-

repeat polymorphism among Brazilian *Enterococcus faecalis* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4879-4881, 2004.

U'REN, J.; SCHUPP, J. M.; PEARSON, T.; HORNSTRA, H.; FRIEDMAN, C. L. C.; SMITH, K. L.; DAUGHERTY, R. R. L.; RHOTON, S. D.; LEADEM, B.; GEORGIA, S.; CARDON, M.; HUYNH, L. Y.; DeSHAZER, D.; HARVEY, S. P.; ROBISON, R.; GAL, D.; MAYO, M. J.; WAGNER, D.; CURRIE, B. J.; KEIM, P. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. **BMC Microbiology**, 2007, 7:23.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2788-2793, 2001.

VENZAL, J. M.; PEÑA, A. E.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; PORTILLO, A.; OTEO, J. A. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. **Parasitol. Latinoam.**, v. 62, p. 23-26, 2007.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; BANETH, G.; MIYASHIRO, S.; STRENGER, C.; WANER, T.; McBRIDE, J. W. Genetic and Antigenic of major Immunoreactive Proteins in Globally Distributed *Ehrlichia canis* Strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 1080-1088, 2008.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo identificou a ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos de Brasília, detectada por PCR em etapa única, utilizando *primers* para a região 16S rRNA. As taxas de prevalência da doença em Brasília (27,9%) corroboram levantamentos realizados em outras regiões do Brasil, nas quais a média situa-se entre 20 a 30% de prevalência. A associação da EMC com as alterações hematológicas de trombocitopenia e anemia demonstrou uma correlação positiva, evidenciando a necessidade da investigação do agente em cães trombocitopênicos e anêmicos. No entanto, a identificação de *E. canis* em cães não-trombocitopênicos indica a possibilidade da infecção ocorrer em animais sem alterações hematológicas, sugerindo-se a pesquisa de *E. canis* em cães com algum sinal clínico de erliquiose.

Foi identificada variabilidade genética entre isolados de *E. canis*. A análise de regiões genômicas de repetição em isolados controle de *E. canis* indicou três locos passíveis de serem utilizados como marcadores moleculares para tipagem (ecaj_0109, ecaj_0017 e ecaj_0221). O maior grau de polimorfismo foi identificado na glicoproteína GP36, que apresentou alelos com 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18 e 21 unidades repetitivas. A ausência da amplificação da região de repetição em *tandem* da GP36 de algumas amostras (n=20) indica cautela na utilização deste gene para fins diagnósticos ou desenvolvimento de vacinas.

Concluindo, os resultados do presente estudo demonstraram a ocorrência de *E. canis* em cães sintomáticos de Brasília, assim como a variação no número de repetições da GP36 das linhagens obtidas na cidade. A variabilidade alélica identificada em três diferentes locos do genoma dos isolados controle de *E. canis* indicam a presença de linhagens geneticamente distintas no Brasil. Aliado a esses achados, a existência de outras regiões de repetição identificadas no genoma de *E. canis* apontam a necessidade de estudos para a caracterização molecular da bactéria. Estes estudos poderiam fornecer um método padronizado para a tipagem de *E. canis*.

ANEXO I - Resumo publicado no 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Brasília, 04 a 06 de outubro de 2007.

MOLECULAR DIAGNOSTIC OF EHRLICHIOSIS IN DOG BLOOD SAMPLES FROM THE FEDERAL DISTRICT OF BRAZIL, BASED ON THE RECENTLY DEVELOPED ONE-ROUND PCR TARGET TO THE *EHRLICHIA CANIS* 16S rRNA GENOMIC SEQUENCE.

M. F. G. Cesar¹, A. M. Greuel¹, D. B. Xavier¹, G. R. Paludo², R. Titze-de-Almeida¹.

1. Molecular Microbiology and Biotechnology Laboratory; 2. Veterinary Clinical Pathology Laboratory, University of Brasília, Brazil.

Introduction

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an infectious disease caused by the Gram-negative bacteria *Ehrlichia canis*. This intracellular microorganism infects cells from the mononuclear phagocytic system, with tropism for monocytes and macrophages (Aguilar et al., 2007). The disease is transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*, which prevalence affects prevalence of the CME in urban areas (Labruna & Pereira, 2001).

The presumptive diagnostic is based on clinical signs and serological tests (Lappin, 2001). In addition, the infectious agent can be directly detected in blood smear or through molecular tests like the polymerase chain reaction – PCR. The PCR is able to identify *E. canis* sequences in blood, tissue samples, cellular cultures and thick samples with high specificity and predictive value (Fenollar & Raoult, 2004; Maggi et al., 2006). However, most PCR protocols have limitations in sensitivity or drawbacks in high throughputs routine laboratories, mainly caused by environmental contamination with amplicons in protocols using two rounds of amplification.

Objective

The present study aimed at examining the sensitivity and reliability of a recently developed PCR protocol performed in one unique round of amplification. The method identifies an *E. canis* 16 S rRNA specie-specific DNA sequence.

Material and methods

We collected 44 blood samples from dogs attended at the Veterinary Hospital of the University of Brasília, Federal District, Brazil, from March until July 2006. The sampled animals showed clinical signs of ehrlichiosis like depression, lethargy, weight loss, anorexia, pyrexia, lymphadenomegaly, splenomegaly, ocular signs and hemorrhages, and, in addition, typical hematological signs as leukopenia, thrombocytopenia, anemia, and morulae in cellular cytoplasm. Two sampled dogs also showed morulae in monocytes directly observed in blood smears. The total DNA was extracted from the blood samples using a commercial kit (QIAmp DNA blood minikit, Qiagen, USA). The PCR mixture contained 10pmol of previously described primers (*EBR1* 5' - CCT CTG GCT ATA GGA AAT TG - 3'e *EBR5* 5' - GGA GTG CTT AAC GCG TTA G - 3'), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.25µL of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), and 1.25U of Taq DNA polymerase (Alves et al., 2005). We used the following PCR amplification program: initial preheating step at 94° for 2 min; initial denaturation step at 94°C for 2min; 40 cycles of amplification (denaturation 94°C for 30 sec, annealing at 53°C for 1min, extension at 72°C for 1min); and a final extension at 72°C for 5min. The PCR products were electrophoresed through a 1% agarose gel stained with ethidium bromide for 1 hour at 60V. The gel was photographed under UV light.

Results and discussion

The PCR protocol identified the *E. canis* rRNA 16S specific sequences in 10 of the 44 blood samples tested (22%). These positive results included the two positive dogs with morulae observed in blood smear testing. In all the positive results we found only one easily visible band with the expected size of 765 bp.

In our study, we used a previously described protocol developed by Alves et al. (2005) that identified *E. canis* sequences through a PCR scheme with only one round of amplification. Our results corroborated the author findings, showing that the method provides simplicity, specificity, and economic, allowing its use in routine diagnostic laboratories. Although the precise level of sensitivity of the method was not tested through successive dilutions of the DNA samples, we found strongest bands in comparison with the classical nested PCR using the primers ECC and ECB. Furthermore, this previous commonly used nested-PCR requires two rounds of

amplification, increasing the manipulation of the samples, therefore rising the risk of contamination with amplification products.

The prevalence rate of 22% found in our work is in agreement with previous studies (Labarthe et al., 2003; Moreira et al., 2003). The authors found that 20% of the dogs attended in veterinary hospitals from the Northeast, South, and Central-west geographic region of Brazil were infected with *E. canis*.

In conclusion, the PCR protocol tested in our study showed the specificity required for the molecular diagnostic of *E. canis* in dog blood samples. The method identifies the target sequence in one round of amplification, which supports high throughput routines and reduces the commonly described risk of contamination caused by the PCR products.

References

- AGUIAR, D. M. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis* **Ciência Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007.
- ALVES, L. M. et al. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 49-54, 2005.
- CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet Parasitol**, v. 119, p. 73–86, 2004.
- FENOLLAR, F. and RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **APMIS**, v. 112, p. 785-807, 2004.
- LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. **Vet Ther.**, v. 4, p. 67-75, 2003.
- LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clin Vet.**, v. 30, p. 24-32, 2001.
- MAGGI, R. G. et al. The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. Int. Canine Vector-Borne Dis Symp. 1st Ed., 2006.
- MOREIRA, S. M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zoot.**, v. 55, p. 141-147, 2003.