



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis* EM CÃES NO DISTRITO
FEDERAL E ENTORNO

SANDY MENEZES HONORATO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA – DF
2021



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis* EM CÃES NO
DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

SANDY MENEZES HONORATO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Orientadora: Prof. Dra. Giane Regina Paludo

**PUBLICAÇÃO 242/21
Brasília**

2021

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HONORATO, Sandy Menezes Título: ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis* EM CÃES NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Animais.

Data 10/06/2021

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Giane Regina Paludo
Presidente/Orientadora - UnB

Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro Membro
Examinador Interno - UnB

Prof.^a Dr.^a Aline Moreira de Souza
Examinador Externo - UFF

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

HONORATO, S.M. **Estudo da Infecção Natural por *Ehrlichia Canis* em Cães no Distrito Federal e Entorno**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2021, 59p. Dissertação de mestrado.

FICHA CATALOGRÁFICA

Há sempre um mundo pra gente fazer
Um mundo filho nosso, com a nossa cara, o mundo que eu disponho agora foi
criado por mim
Euzin, pobre curumim, rico, franzino e risonho, sou milionário do sonho.

Emicida

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à professora Giane Regina Paludo. Por me orientar, me ensinar a ser uma melhor profissional e melhor ser humano.

À minha família, aos meus pais Misheline e Jacy, aos meus irmãos Johnny e Sarah, ao meu sobrinho Otto, à minha velhinha Fatima, por todo amor, estímulo, inspiração e compreensão durante toda minha trajetória. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus amigos, Mariana, Alana, Isabela, Adriana, Gutargo, por todo carinho, companheirismo, compreensão e apoio.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica da UnB, por todo auxílio em todas as etapas desse e de outros trabalhos.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais pela oportunidade cedida para executar tal projeto e ampliar meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e de incentivo à pesquisa.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Objetivos específicos	12
3.0 Revisão de Literatura	13
CAPÍTULO 2	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
1.0. Introdução	30
2.0 Material e Métodos.....	31
2.1 Aspectos Éticos.....	31
2.2 Colheitas das amostras.....	31
2.3.1 Análises hematológicas e bioquímicas.....	31
2.3.2 Ensaio Molecular	32
3.0 Análise Estatística	36
4.0 Resultados	37
5.0 Discussão.....	48
6.0 Conclusões.....	53
7.0 Referências Bibliográficas.....	52

RESUMO

A erliquiose é uma enfermidade presente em todos os estados brasileiros, frequentemente associada às alterações hematológicas em cães. O objetivo deste trabalho foi relatar a ocorrência da infecção natural por *E. canis* por meio da reação da polimerase em cadeia convencional (cPCR), avaliar a presença dos genes das glicoproteínas gp-36 e gp-19 e correlacionar a infecção com as alterações laboratoriais. No estudo, foram incluídos 206 cães em cães assintomáticos para hemoparasitose escolhidos por conveniência e aleatoriamente, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos localizados nas cidades do entorno do Distrito Federal. Como resultado, 14/206 (6,79%) cães foram positivos para *E.canis* por meio da cPCR. Essas amostras positivas para *E. canis* resultaram em 100% (14/14) e 28,6% (4/14) de positividade para os genes das glicoproteínas gp19 e gp36, respectivamente. As alterações hematológicas mais frequentes encontradas no grupo dos cães com a infecção foram trombocitopenia 57,2%(P= 0,002), anemia 35,7% (P 0,003) e leucopenia 14,3% (P= 0,03). As análises da bioquímica sérica não apresentaram diferença estatística entre os animais positivos e negativos para erliquiose e também não houve ocorrência das alterações dos perfis bioquímicos entre os infectados. Conclui-se que o Distrito Federal e entorno possuem baixa ocorrência do agente em cães assintomáticos para hemoparasitose, além disso, a identificação da *E.canis* envolvendo novos oligonucleotídeos permite potencializar o conhecimento sobre a espécie na região e que as alterações laboratoriais sugestivas da infecção foram encontradas nos animais positivos mesmo na ausência de sinais clínicos comuns

PALAVRAS CHAVES: 1. Hematologia. 2. Erliquiose. 3. PCR. 4. Glicoproteínas.

ABSTRACT

Ehrlichiosis is a disease present in all Brazilian states, often associated with hematological changes in dogs. The objective of this study was to report the occurrence of natural infection by *E. canis* by means of the conventional polymerase chain reaction (cPCR), to evaluate the presence of the genes of the gp-36 and gp-19 glycoproteins, and to correlate the infection with laboratory changes. In the study, 206 dogs chosen by convenience and randomly, treated at the Veterinary Hospital of the University of Brasília, at Veterinary Clinics of Brasília, and at shelters located in the cities surrounding the Federal District were included in the study. As a result, 14/206 (6.79%) dogs were positive for *E. canis* by cPCR. These positive samples for *E. canis* resulted in 100% (14/14) and 28.6% (4/14) positivity for the gp19 and gp36 glycoprotein genes, respectively. The most frequent hematological changes found in the group of dogs with the infection were thrombocytopenia 57.2% ($P = 0.002$), anemia 35.7% ($P = 0.003$) and leukopenia 14.3% ($P = 0.03$). The analyzes of serum biochemistry showed no statistical difference between positive and negative animals for Ehrlichiosis and there was also no occurrence of changes in the biochemical profiles among those infected. It is concluded that the Federal District and its surroundings have a low occurrence of the agent in dogs asymptomatic for hemoparasitosis, in addition, the identification of *E. canis* involving new oligonucleotides allows to enhance knowledge about the species in the region and that the laboratory alterations suggestive of the infection were found in positive animals even in the absence of common clinical signs.

KEYWORDS: 1. Hematology. 2. Ehrlichiosis. 3. PCR. 4. Glycoproteins.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1. Filogenia da família Anaplasmataceae com base em sequências do gene 16S rRNA. Fonte: COHN, 2003. 14
- Figure 2. Ciclo de vida da *Ehrlichia canis*. Fonte: SYKES, 2013..... 16
- Figure 3. Matriz de Identidade de sequências parciais gp19 para isolados de *Ehrlichia canis*. 43
- Figure 4. . Rede de TCS da sequência do gp19- *E.canis* obtida no Distrito Federal e entorno. 44
- Figure 5. Sequências parciais da gp 19 a nível de aminoácido de *E. canis* alinhadas, evidenciando as mutações entre os isolados e grupos de haplótipos.....45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Oligonucleotídeos, genes alvos e tamanhos dos produtos de PCR utilizados para detecção de *Ehrlichia canis*, GP19, GP36 e a enzima GAPDH. 34
- Tabela 2. Valores obtidos dos hemogramas dos cães positivos na cPCR para *E. canis* do Distrito Federal e entorno atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos. 37
- Tabela 3. Valores obtidos na bioquímica sérica dos cães positivos na cPCR para *E. canis* do Distrito Federal e entorno atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos. 38
- Tabela 4. Média e desvio padrão dos valores hematológicos dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da PCR para *E. canis*. .. 39
- Tabela 5. Média e desvio padrão da bioquímica sérica dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da PCR para *E. canis*. .. 39
- Tabela 6. Dados da frequência de cães negativos e positivos vs anormalidades hematológicas. 40
- Tabela 7. Valores do VG, plaquetas e leucócitos dos animais positivos para *E. canis* com alterações laboratoriais. 40
- Tabela 8. Principais dados hematológicos dos cães naturalmente infectados por *E. canis*, diagnosticados por meio da PCR e positivos para as glicoproteínas 19 e 36.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALB – Albumina

ALT – Alanina Aminotransferase

CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Trifosfato de Desoxirribonucleosídeos

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FA – Fosfatase Alcalina

FAV - Faculdade de Agronomia e Veterinária

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

mM – Milimol

PB – Pares de base c

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia convencional

pMol – Picomol

RNA – Ácido Ribonucleico

VCM – Volume Corpuscular Médio

VG – Volume Globular

°C – Graus Celsius de Temperatura

µL – Microlitros

% - Porcentagem



CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.0 Introdução

As doenças zoonóticas humanas e caninas vêm emergindo e reemergindo em todo o mundo, constituindo um grande desafio para a medicina veterinária e humana. Dentre as infecções zoonóticas reemergentes estão as doenças causadas pelos agentes da ordem Rickettsiales, compreendendo a família Anaplasmataceae - *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Neorickettsia* spp. (DAY MJ, 2011 e DUMLER et al., 2001).

Os cães atuam como hospedeiro reservatório para a *Ehrlichia* spp. e também como hospedeiros de manutenção para o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, de importância para saúde pública devido ao seu potencial de carregar e transmitir patógenos para os animais e seres humanos (DANTAS F., 2008; GROVES G. et al., 1975; PAROLA et al., 2005). *E. canis* é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória encontrada predominantemente em células mononucleadas, onde se replica por divisão binária para formação das mórulas. As mórulas são constituídas por meio da união de corpúsculos elementares envoltos por uma membrana (COHN, 2003).

A patogênese da infecção por *E. canis* compreende três fases clínicas: aguda, subclínica e crônica com sinais clínicos inespecíficos como febre, petéquias e anorexia. Além disso, são encontradas alterações laboratoriais como anemia normocítica normocrômica leve a moderada e não regenerativa; leucopenia por neutropenia e linfopenia, monocitose e trombocitopenia (VIEIRA et al., 2011; BULLA et al., 2004).

Em virtude das diferentes fases que a infecção pode apresentar e por suas múltiplas manifestações clínicas, o diagnóstico definitivo geralmente é um desafio, podendo ser realizado por meio de técnicas tradicionais como exame parasitológico direto, testes sorológicos, cultura e técnicas de diagnóstico molecular (HARRUS & WANER, 2011). Atualmente, estudos genéticos estão utilizando grupos de proteínas de superfície 19 e 36 kDa (GP19 e GP36) no diagnóstico sorológico da erliquiose monocítica canina e na caracterização molecular de diversas cepas do gênero *Ehrlichia* spp. (AGUIAR et al., 2016). Destaca-se, aqui, a aplicação de novos meios de diagnóstico molecular que acrescentem e auxiliem na identificação da espécie *E. canis* no Distrito Federal e entorno assim como o estabelecimento da ocorrência da infecção e suas alterações laboratoriais.

2.0. Objetivo geral

Investigar a ocorrência de *Ehrlichia canis* e suas alterações nos exames laboratoriais de cães do Distrito Federal e Entorno.

2.1. Objetivos específicos

- Realizar detecção de *E. canis* em amostras de sangue de cães por meio da Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR);
- Realizar detecção das glicoproteínas 36 e 19 nas amostras de *E. canis* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR);
- Determinar as principais alterações hematológicas e bioquímicas ocasionadas nos cães infectados por *E. canis*.

3.0 Revisão de Literatura

Pertencentes à família *Anaplasmataceae*, as espécies do gênero *Ehrlichia* são bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, transmitidas por carrapatos que infectam células endoteliais e leucócitos de diferentes mamíferos em regiões tropicais e subtropicais, destacam-se por possuírem potencial zoonótico. De acordo com as análises filogenéticas dos genes 16S rRNA, groESL e proteínas de superfície estão classificadas ao gênero as espécies *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii* e *E. canis* (Fig. 1).

E. chaffeensis é o agente zoonótico da Ehrlichiose Monocítica Humana, transmitida pelo *Amblyomma americanum* e apresenta tropismo por células monucleadas. Foi reportada pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1986, e ainda apresenta grande índice de infecção no Sul dos Estados Unidos, cuja infecção caracteriza-se por apresentar febre, cefaleia, mialgia, mal-estar, náusea, vômito, diarreia e dor abdominal (JENNIFER Y. et al., 2020 e PENG S. et al., 2019). Contudo, no Brasil, estudos com análise de anticorpos, a *E. chaffeensis* já foi descrita em cervos e felinos através de estudos com diagnóstico molecular (MACHADO et al., 2006; BRAGA M. et al., 2012).

E. ruminantium foi relatada infectando neutrófilos e células endoteliais de ruminantes domésticos e silvestres da África do Sul, Ilhas do Caribe e da Oceania, sua transmissão ocorre pelo carrapato *Amblyomma variegatum*. A doença é conhecida como a “Heartwater” e é particularmente importante para a África Subsaariana por causar perdas econômicas na produção de carne e leite (ALLSOPP A., 2015). Até o presente momento não há relatos de *E. ruminantium* no Brasil (VIERIA et al., 2011)

E. ewingii infecta células granulocíticas, e é o agente da erliquiose granulocítica em cães e humanos com predominância no Sul dos Estados Unidos, e a transmissão ocorre pelo carrapato *Amblyomma americanum* (LITTLE S. et al., 2010). Em cães a infecção está associada à anemia hemolítica imunomediada, trombocitopenia, neutrofilia, doença renal com proteinúria e aumento da atividade das enzimas hepáticas (QUROLLO B. et al., 2019). A detecção molecular desta espécie no Brasil é considerada rara, pois há poucos relatos em cães (AGUIAR et al., 2019; OLIVEIRA L. et al., 2009).

E. canis é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), relatada em animais em todo mundo, endêmica no Brasil. O agente infecta predominantemente células mononucleares, porém, há alguns relatos da presença das mórulas erliquiais em células granulocíticas (AGUIAR et al., 2019 e MYLONAKIS et al., 2011).

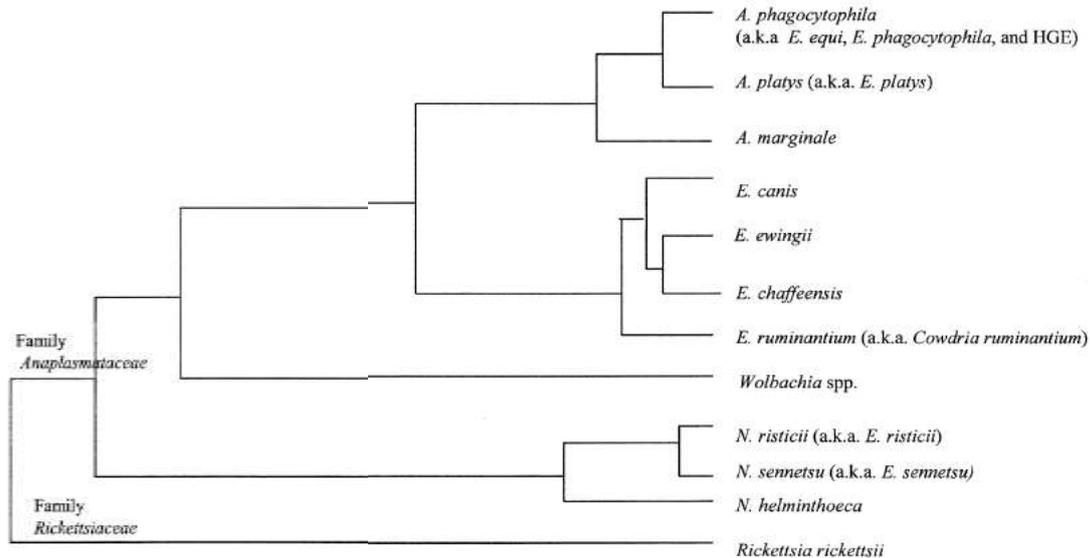


Figure 1. Filogenia da família Anaplasmataceae com base em sequências do gene 16S rRNA. Fonte: COHN, 2003.

E. canis foi descrita pela primeira vez por DONATIEN & LESTOQUARD em um cão da raça Pastor Alemão no Instituto Pasteur na Argélia em 1935, que relataram a presença de pequenas estruturas semelhantes à *Rickettsia* no interior de monócitos, e denominaram como *Rickettsia canis*. Em 1945, por conter propriedades morfológicas e biológicas compatíveis com o gênero *Ehrlichia* foi renomeada para *Ehrlichia canis* por Mashkovsky em homenagem a Paul Ehrlich, bacteriologista alemão (RISTIC et al., 1984).

No Brasil, o primeiro caso de erliquiose foi descrito por Costa et al. (1973), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Os autores identificaram mórulas nos leucócitos de um esfregaço sanguíneo de um cão naturalmente infectado que apresentava febre, anorexia e inapetência. Carrilo et al. (1976) relataram a primeira ocorrência no Rio de Janeiro da doença em cães da Polícia Militar no Regimento de Olaria. Nos anos seguintes a EMC se tornou uma das principais patologias identificadas e tratadas em clínicas veterinárias dos estados do Sudeste, Sul, Centro-oeste e Nordeste do Brasil (TAQUES et al., 2020).

No estudo baseado na principal proteína imunorreativa, a gp36 da *E. canis*, com intuito de descrever a distribuição dos genótipos americano (USTRP36), brasileiro (BrTRP36) e costa-riquenho (CRTRP36) de *E. canis* no Brasil, concluiu-se que os genótipos americano (USTRP36) e brasileiro (BrTRP36) de *E. canis* estão distribuídos uniformemente nos estados brasileiros, enquanto que a região Sul do país apresenta menor taxa de prevalência (TAQUES I et al., 2020). Ferreira et al (2014) demonstraram que o gene gp19 demonstra elevado grau de conservação em amostras provenientes do estado do Rio de Janeiro.

Os cães desempenham a função de hospedeiro reservatório para *E. canis* e também atuam como hospedeiro para a manutenção do vetor primário, o *R. sanguineus* que é um *Ixodidae* de grande importância para saúde pública pelo potencial de carregar e transmitir patógenos para os animais e para os seres humanos (DANTAS F., 2008; GROVES G. et al., 1975; PAROLA et al., 2005). No ambiente o *R. sanguineus* busca por lugares com sombra, pouca ventilação, pode ser da biomassa, fendas rochas, paredes de habitações com falhas, móveis e sacadas (SERRA FREIRE et al., 2011).

Rhipicephalus sanguineus é o principal vetor da EMC, e a infecção do carrapato ocorre no repasto, quando são ingeridas células que possuem as mórulas de *E. canis* (LEWIS et al., 1977). Uma vez no interior do *Ixodidea*, ocorrerá a multiplicação da *E. canis* nas suas células epiteliais do intestino médio e nas glândulas salivares, por um período de incubação que varia de 7 a 21 dias. O carrapato uma vez infectado poderá transmitir a *E. canis* por forma transtadial por um período de 155 dias e, como não ocorre transmissão transovariana, as larvas de *R. sanguineus* não são importantes na transmissão (Figura 2) (BREMER et al., 2005).

O ciclo de manutenção da *E. canis* é sobretudo pernicioso, porque as populações do *R. sanguineus* podem se estabelecer e se manter ativas em qualquer época do ano, principalmente em áreas urbanas de países tropicais e subtropicais. O *R. sanguineus* apresentam hábitos nidícolas, intervalo de gerações curtas e podem permanecer dentro de ambiente como em casas e canis, proporcionando uma fonte constante de infecção para cães (DANTAS F., 2008; DRYDEN M, PAYNE P., 2004).

infecção, podendo acarretar em hipoplasia e aplasia medular, com consequente óbito do paciente (HARUS et al.,2012).

As principais alterações encontradas em cães naturalmente infectados são anemia normocítica normocrômica leve a moderada e não regenerativa; leucopenia por neutropenia e linfopenia, monocitose e trombocitopenia (VIEIRA et al., 2011; BULLA et al., 2004). Apesar dos achados laboratoriais de cães com erliquiose serem inespecíficos, quando associados aos sinais clínicos como febre, anorexia, esplenomegalia, uveítes e ao histórico da presença de carrapatos podem sugerir a infecção (HARVEY J. 2006; HARRUS e WANER, 2011 e SAINZ A. et al.,2015).

A alteração laboratorial mais frequente em todas as fases da ehliquiose é a trombocitopenia, resultado de diversos mecanismos, tais como, aumento do consumo, vasculite, supressão da medula e processos imunomediados (SHROPSHIRE et al., 2019). Na fase aguda é possível observar trombocitopenia com presença de macroplaquetas, a anemia muitas vezes não apresenta regeneração e nesta fase a leucocitose está associada à monocitose, porém, a leucopenia também tem sido relatada (BORIN et al., 2009; CASTRO et al., 2004).

Na fase subclínica da infecção é possível observar trombocitopenia leve a moderada, no perfil das proteínas séricas por eletroforese a elevação na concentração de β -globulina e uma gamopatia policlonal, anemia leve e leucopenia variável (HEEB HL, 2003). Na fase crônica os achados são anemias, leucopenias e trombocitopenias severas, a pancitopenia, devido à hipoplasia ou aplasia medular (VIEIRA et al., 2011).

As alterações descritas na bioquímica sérica são inespecíficas, porém podem ser observadas nas três fases da infecção. A azotemia pré-renal e renal é observada devido à diminuição na perfusão renal e por lesão renal que é descrita como uma glomerulopatia membranoproliferativa e nefrite intersticial. O dano ocasionado no fígado é relatado pela lesão hepatocelular ou estresse oxidativo sistêmico resultando no aumento da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e a elevação da bilirrubina total (COHN, 2003; COSTA et al., 2015).

O diagnóstico definitivo da *E. canis* é um desafio em virtude das diferentes fases que a infecção pode apresentar-se e por suas múltiplas manifestações clínicas. O diagnóstico pode ocorrer pela visualização do agente no esfregaço sanguíneo, por meio de anticorpos específicos e por testes moleculares. Cabe

salientar que a sensibilidade e especificidade desses testes variam de acordo com a fase da infecção (NEER et al., 1998 e NAVARRETE M. et al., 2018).

A identificação direta da mórula de *E. canis* em amostras de sangue periférico pode confirmar o diagnóstico da erliquiose, porém, a ausência do achado do parasita não exclui o diagnóstico, pois poucas mórulas são visíveis na fase aguda da infecção (NYINDO et al., 1980; MENGFAN et al. 2020). Em um estudo experimental com cães da raça Pastor Alemão inoculados com cepas de *E. canis* foi observado no 12º dia da infecção os sinais clínicos da infecção aguda e a presença das mórulas em células mononucleares (CASTRO et al., 2004).

Os testes sorológicos mais utilizados para o diagnóstico são a imunoabsorção enzimática (ELISA) e a imunofluorescência indireta (IFA). A partir de sete dias da infecção é possível observar a produção de IgM e com 15 dias a IgG, inicialmente a titulação de anticorpo é baixa (640) porém com o decorrer da infecção é observado aumento significativo (2560-20.480), por isso um bom método de escolha para o monitoramento da terapêutica é a IFA (MYLONAKIS M., 2019). O teste ELISA é utilizado como teste de triagem para detectar presença ou ausência da infecção, porém, não viabiliza a observação do declínio ou ascensão dos anticorpos (GALEMORE et al., 2018).

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é altamente sensível e proporciona a amplificação de quantidades mínimas de DNA, possibilitando diagnóstico rápido e preciso, determinando as espécies de *Ehrlichia* que podem estar infectando o animal (ROMERO et al., 2010). Contudo, resultados de PCR falso-negativos já foram relatados devido ao sequestro do agente por órgãos do sistema monocítico fagocitário, influenciando assim a amplificação da PCR, pois a carga bacteriana estava abaixo da sensibilidade analítica do teste. O DNA erliquial já foi detectado em amostras de sangue periférico, aspirados de baço, fígado e medula (HARRUS et al., 2004).

A sequência do gene *16S rRNA* é utilizada como o principal marcador molecular para filogenia por apresentar cerca de 99,4 a 100% de identidade entre os isolados de vários países, porém fornece poucas informações quando procura-se saber sobre a diversidade genética da espécie. Essa propriedade restringe estudos que têm como objetivo a caracterização de espécies e ou de novas variantes do mesmo gênero (MENGFAN et al., 2020).

Os genomas do gênero *Ehrlichia*, demonstram um elevado grau de sintaxe

genômica, família de proteínas parálogas, repetições em tandem e domínios de proteínas associadas às estratégias adaptativas de evasão imune e nas interações entre hospedeiro e patógeno, e um viés único de serina-treonina associado a um potencial para a glicosilação e fosforilação (MCBRIDE e WALKER, 2011). As principais proteínas imunorreativas identificadas e caracterizadas molecularmente são glicoproteínas ricas em serina que são secretadas durante a interação hospedeiro-vetor.

Várias glicoproteínas têm repetições em tandem, regiões codificantes e não codificantes do genoma que tem sido vinculada a um processo ativo de expansão e redução de genomas erliquiais e é considerada uma das principais fontes de instabilidade e mudança genômica (FRUTOS et al., 2006). Os grupos de proteínas repetidas em tandem de 19 e 36 kDa (gp19 e gp36) foram caracterizadas como as mais importantes proteínas imunorreativas de *E. canis* e são empregadas no diagnóstico sorológico de EMC e na caracterização molecular de diversas cepas (AGUIAR et al., 2016).

A glicoproteína gp19 consiste em um conjunto polipeptídico localizado na superfície da membrana extracelular, indicando que a proteína é secretada durante a infecção, com aproximadamente 19 kDa compreendendo o principal epítipo de células B. Sua sequência é altamente conservada entre as cepas de *E. canis* já descritas no Brasil e em outros países, esta característica e a associação aos componentes da membrana da mórula possibilita o estudo de métodos de diagnósticos sorológicos e que futuras vacinas sejam realizadas através desta sequência (MCBRIDE et al., 2011, DOYLE, 2017).

A glicoproteína gp 36 é uma proteína rica em serina, intimamente ligada à primeira interação entre o patógeno e o hospedeiro no momento da colonização intracelular e no processo adaptativo. A diversidade deste fragmento pode ser relacionada com a pressão imunológica sofrida quando há infecção em diferentes espécies de hospedeiros em diversas áreas geográficas (AGUIAR et al., 2016).

O sequenciamento do gene que codifica a gp36 em cepas de *E. canis* de países como nos Camarões, Estados Unidos, Israel e no Brasil demonstraram variações no número de repetições de Tandem e alterações de ácido nucleico com substituições de quatro aminoácidos e por a gp36 ser um importante local de reconhecimento sorológico, essa diferença resultou numa alteração antigênica que não é reconhecida por anticorpos anti-TRP36 de sequências heterólogas, além

disso, a diversidade de cepas dispersas em diferentes regiões ainda não está esclarecida (ARROYAVE E. et al., 2020; AGUIAR et al., 2013; ZHANG et al., 2008).

4.0 Referências Bibliográficas

AGUIAR, D.M.; ZHANG, X.; MELO, A.L.T.; PACHECO, T.A.; MENESES, A.M.C.; ZANUTTO, M.S.; HORTA, M.C.; SANTARÉM, V.A.; CAMARGO, L.M.A.; MCBRIDE, J.W.; LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.315-321, 2013.

AGUIAR, DANIEL M; ZHANG, XIAOFENG; MCBRIDE, JERE W; A BRAGA, ISIS; TAQUES, ISIS I G G. Detection of genotype-specific Ehrlichia canis exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. **Ticks Tick Borne Dis.** v. 7, n. 1, p. 142-145, fev. 2016.

AGUIAR, DANIEL; ZHANG, XIAOFENG; W.MCBRIDEA, ISIS A.BRAGA JERE; I.G.G.TAQUE, ISIS; W.MCBRIDE, JERE. Detection of genotype-specific Ehrlichia canis exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. **Ticks And Tick-Borne Diseases**.v. 7, n. 1, p. 142-145, fev. 2016.

ALLSOPPI, B.A. Natural history of Ehrlichia ruminantium. **Vet. Parasitol.** v.167,p.123–135. 2015.

ANDRÉIA LIMA TOMÉ MELO, TIAN LUO, XIAOFENG ZHANG, LÍVIA SAAB MURARO, NATHALIA ASSIS PEREIRA, ALEJANDRO CABEZAS-CRUZ, FILIPE DANTAS-TORRES, JERE W. MCBRIDE, DANIEL MOURA DE AGUIAR, Serological evidence of Ehrlichia minasensis infection in Brazilian dogs, **Acta Tropica.** v. 67, n. 52, p. 135-141, nov. 2019.

ARROYAVE, Esteban; RODAS-GONZÁLEZ, Juan D.; ZHANG, Xiaofeng; LABRUNA, Marcelo B.; GONZÁLEZ, María S.; FERNÁNDEZ-SILVA, Jorge A.; MCBRIDE, Jere W.. Ehrlichia canis TRP36 diversity in naturally infected-dogs from an urban area of Colombia. **Ticks And Tick-Borne Diseases.** v. 11, n. 3, p. 1-6, maio 2020

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

BRAGA, M. D. S. C. D. O. et al. Molecular and serological detection of Ehrlichia spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 37-41, 2012.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1-2, p.95-105, 2005.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO, JR., J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet Res**, n.35, n.35, p.1441-146, 2004

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.

COHN, L. Ehrlichiosis and related infections. **Vet. Clin.Small Anim** ., v.33, n.33, p.863–884, 2003. COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

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

DAY, Michael J. One health: the importance of companion animal vector-borne 1. 4, n. 49, p. 2-6, 2011.

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, n.4, p.504-510, 2005.

DRYDEN MW, PAYNE PA. Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. **Vet Ther.** v 5.n.2 p.139–54, 2004.

DUMLER, J. STEPHEN; BARBET, ANTHONY F.; BEKKER, CORNELIS P. J.; DASCH, GREGORY A.; PALMER, GUY H.; RAY, STUART C.; RIKIHISA, YASUKO; RURANGIRWA, FRED 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. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**.v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; CASTRO, T.X.; FERREIRA, E.O.; NEVES, F.P.G.; BARBOSA, A.V.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.P. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Braz. Parasitol. Vet.** v.23, n.3, p.301-308, 2014.

FRUTOR, R. et al. Comparative genomic analysis of three strains of Ehrlichia ruminantium reveals an active process of genome size plasticity. **Journal of Bacteriology**,v. 188, P. 2533-2542, 2006.

GROVES MG, DENNIS GL, AMYX HL, et al. Transmission of Ehrlichia canis to dogs by ticks (Rhipicephalus sanguineus). **Am J Vet Res** 1975;36(7):937-40.

HARRUS S, WANER T, NEER TM. *Ehrlichia canis* infection. In: Greene CE (edit.). **Infectious diseases of dogs and cats**. Elsevier, Missouri. p. 227-238, 2012.

HARVEY JW. Thrombocytotropic anaplasmosis (A.platys [E.platys] infection). In: Greene CG, editor. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd ed. St. Louis: Saunders Elsevier; p. 229-31. 2006.

HEEB HL, WILKERSON MJ, CHUN R, GANTA RR. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. **J Am Anim Hosp Assoc**. v39(4):379-84. 2003.

LEWIS JR., G.E.; RISTIC, M.; SMITH, R.D.; LINCOLN, T.; 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.

Little SE, O'Connor TP, Hempstead J, et al. Ehrlichia ewingii infection and exposure rates in dogs from the southcentral United States. **Vet Parasitol**. 2010.

MACHADO RZ, DUARTE JM, DAGNONE AS, SZABÓ MP. Detecção de *Ehrlichia chaffeensis* em cervo-do-brejo (*Blastocerus dichotomus*). **Vet Parasitol**. 139 (1-3). 2006.

MCBRIDE, J.W., WALKER, D.H.. Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. **Expert Rev. Mol. Med**. v.13,p. 3, 2011

MENGFAN, Q., LIXIA, W., YING, L., YAN, R., KUOJUN, C., JINSHENG, Z., ZAICHAO, Z., WEIWEI, Y., YELONG, P., XUEPENG, C., CHONGYANG, L., JUN, Q., & QINGLING, M. Molecular detection and genetic variability of *Ehrlichia canis* in pet dogs in Xinjiang, China. **Veterinary world**, 13(5), 916–922. 2020.

MURARO, L. S., SOUZA, A. O., LEITE, T., CÂNDIDO, S. L., MELO, A., TOMA, H. S., CARVALHO, M. B., DUTRA, V., NAKAZATO, L., CABEZAS-CRUZ, A., & AGUIAR, D. M. First Evidence of *Ehrlichia minasensis* Infection in Horses from Brazil. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, 10(3), 265. vol. 10,3 265. 25 Feb. 2021.

MYLONAKIS, MATHIOS; HARRUS, SHIMON; B.BREITSCHWERDT, Edward. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The Veterinary Journal**, [s. l], v. 246, p. 45-53, abr. 2019.

MYLONAKIS, ME , BORJESSON, DL , LEONTIDES, L. , SIARKOU, VI , THEODOROU, K. , & KOUTINAS, AF. Padrões citológicos de linfadenopatia na erliquiose monocítica canina . **Veterinary Pathology clínica**. v.40,p. 78 - 83 . 2011.

NAVARRETE, Maylin G.; CORDEIRO, Matheus D.; SILVA, Claudia B.; MASSARD, Carlos Luiz; LÓPEZ, Eugenio R.; RODRÍGUEZ, Julio César A.; RIBEIRO, Carla C.D.u.; RODRÍGUEZ, Osvaldo F.; FONSECA, Adivaldo H.. Serological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* and associated risk factors in dogs domiciled in western Cuba. **Veterinary Parasitology: Regional Studies And Reports**.v. 14, p. 170-175, 2018.

NEER, T. M. et al. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection, **J. Vet. Int. Med**, v.13, p. 501-504, 1999.

NYINOD, M.; HUXSOLL, D.L; RISTIC, M.;KAKOMA, I.;BROWN,J.L.; CARSON,C.A.;STEPHENSON, E.H.Cell-mediated and humoral responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p. 250-254, 1980.

OLIVEIRA, LS , OLIVEIRA, KA , MOURÃO, LC , PESCATORE, AM , ALMEIDA, MR , CONCEIÇÃO, LG, MAFRA, C. Primeiro relato de *Ehrlichia ewingii* detectado por investigação molecular em cães do Brasil . **Clinical Microbiology and Infection**.v 2, p. 55 – 56. 2009.

PAROLA, P., DAVOUST, B. & RAOULT, D. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Vet. Res**. v.36.p 469-492,2005.

PENG, SHIH-HUAN; YANG, SU-LIN; HO, YU-NI; CHEN, HSIANG-FEI; SHU, PEI-YUN. Human Case of Ehrlichia chaffeensis Infection, Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**. v. 25, n. 11, p. 2141-2143, nov. 2019.

QUROLLO BA, BUCH J, CHANDRASHEKAR R, BEALL MJ, BREITSCHWERDT EB, YANCEY CB, CAUDILL AH, COMYN A. Clinicopathological findings in 41 dogs (2008-2018) naturally infected with Ehrlichia ewingii. **J Vet Intern Med**. Mar;33(2):618-629. 2019.

RISTIC, M. AND HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In:N.R.Krieg and J.G.Holt (eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. v.1 p.704–709,1984.

SAINZ, A., X. ROURA, G. MIRO, A. ESTRADA-PENA, B. KOHN, S. HARRUS, AND L. SOLANO-GALLEGO. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasit Vectors** 8: 75. 2015

SERRA-FREIRE, N. M; SENA, L. M. M; BORSOI, A. B. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis** 4 (2): 67-72 (2011).

SHROPSHIRE, SARAH; OLVER, CHRISTINE; LAPPIN, MICHAEL. Characteristics of hemostasis during experimental Ehrlichia canis infection. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**.p. 1-9, mar. 2018.

TAQUES, I.I.G.G.; CAMPOS, A.N.S.; KAVASAKI, M.L.; DE ALMEIDA, S.L.H.; DE AGUIAR, D.M. Geographic Distribution of Ehrlichia canis TRP Genotypes in Brazil. **Vet. Sci**. v.7 p. 165. 2020.

VIEIRA RFC, BIONDO AW, GUIMARÃES AMS, SANTOS AP, SANTOS RP, DUTRA LH, et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**. V. 20. P.1–12. 2011.

WANG, JENNIFER Y.; ZHU, BING; PATTERSON, LANISHA L.; ROGAN, MADISON R.; KIBLERI, CLAY E.; MCBRIDEID, JERE W.. Ehrlichia chaffeensis TRP120-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of tumor suppressor FBW7 increases oncoprotein stability and promotes infection. **Plos Pathog**. v. 4, n. 16, p. 1-23, abr. 2020.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.15, n.7, p.1080-1088, 2008.



CAPÍTULO 2

ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis* EM CÃES NO DISTRITO
FEDERAL E ENTORNO

BRASÍLIA
2021

RESUMO

A erliquiose é uma enfermidade presente em todos os estados brasileiros, frequentemente associada às alterações hematológicas em cães. O objetivo deste trabalho foi relatar a ocorrência da infecção natural por *E. canis* por meio da reação da polimerase em cadeia convencional (cPCR), avaliar a presença dos genes das glicoproteínas gp-36 e gp-19 e correlacionar a infecção com as alterações laboratoriais. No estudo, foram incluídos 206 cães em cães assintomáticos para hemoparasitose escolhidos por conveniência e aleatoriamente, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos localizados nas cidades do entorno do Distrito Federal. Como resultado, 14/206 (6,79%) cães foram positivos para *E.canis* por meio da cPCR. Essas amostras positivas para *E. canis* resultaram em 100% (14/14) e 28,6% (4/14) de positividade para os genes das glicoproteínas gp19 e gp36, respectivamente. As alterações hematológicas mais frequentes encontradas no grupo dos cães com a infecção foram trombocitopenia 57,2%(P= 0,002), anemia 35,7% (P 0,003) e leucopenia 14,3% (P= 0,03). As análises da bioquímica sérica não apresentaram diferença estatística entre os animais positivos e negativos para erliquiose e também não houve ocorrência das alterações dos perfis bioquímicos entre os infectados. Conclui-se que o Distrito Federal e entorno possuem baixa ocorrência do agente em cães assintomáticos para hemoparasitose, além disso, a identificação da *E.canis* envolvendo novos oligonucleotídeos permite potencializar o conhecimento sobre a espécie na região e que as alterações laboratoriais sugestivas da infecção foram encontradas nos animais positivos mesmo na ausência de sinais clínicos comuns.

PALAVRAS CHAVES: 1. Hematologia. 2. Erliquiose. 3. PCR. 4. Glicoproteínas.

ABSTRACT

Ehrlichiosis is a disease present in all Brazilian states, often associated with hematological changes in dogs. The objective of this study was to report the occurrence of natural infection by *E. canis* by means of the conventional polymerase chain reaction (cPCR), to evaluate the presence of the genes of the gp-36 and gp-19 glycoproteins, and to correlate the infection with laboratory changes. In the study, 206 dogs chosen by convenience and randomly, treated at the Veterinary Hospital of the University of Brasília, at Veterinary Clinics of Brasília, and at shelters located in the cities surrounding the Federal District were included in the study. As a result, 14/206 (6.79%) dogs were positive for *E. canis* by cPCR. These positive samples for *E. canis* resulted in 100% (14/14) and 28.6% (4/14) positivity for the gp19 and gp36 glycoprotein genes, respectively. The most frequent hematological changes found in the group of dogs with the infection were thrombocytopenia 57.2% ($P = 0.002$), anemia 35.7% ($P 0.003$) and leukopenia 14.3% ($P = 0.03$). The analyzes of serum biochemistry showed no statistical difference between positive and negative animals for Ehrlichiosis and there was also no occurrence of changes in the biochemical profiles among those infected. It is concluded that the Federal District and its surroundings have a low occurrence of the agent in dogs asymptomatic for hemoparasitosis, in addition, the identification of *E. canis* involving new oligonucleotides allows to enhance knowledge about the species in the region and that the laboratory alterations suggestive of the infection were found in positive animals even in the absence of common clinical signs.

KEYWORDS: 1. Hematology. 2. Ehrlichiosis. 3. PCR. 4. Glycoproteins.

1.0. Introdução

O Brasil tem a segunda maior população de cães do mundo, estimada em cerca de 54,2 milhões, perdendo apenas para os Estados Unidos da América (IBGE). A erliquiose, doença transmitida por meio da picada do carrapato *R. sanguineus*, é considerada a principal hemoparasitose dos cães e já foi relatada em todas as regiões brasileiras. A erliquiose monocítica canina (EMC) é causada pela *E. canis*, bactéria que tem tropismo por monócitos e macrófagos de canídeos domésticos e silvestres (DUMLER et al., 2001).

As infecções por *E. canis* podem ocasionar frequentemente casos de anemia, trombocitopenia, leucopenia e até mesmo pancitopenia em cães com diferentes idades. Apesar dos achados laboratoriais de cães com erliquiose serem inespecíficos, quando associados aos sinais clínicos como febre, anorexia, esplenomegalia, uveítes e ao histórico da presença de carrapatos podem sugerir a infecção (HARVEY J. 2006; HARRUS e WANER, 2011 e SAINZ A. et al.,2015).

Inúmeros testes para o diagnóstico da erliquiose estão disponíveis, dentre eles, PCR, dot-blot ELISA, reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) e a identificação direta do parasita através de esfregaços sanguíneos. A PCR é o teste que apresenta maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, permitindo o estudo de ocorrência em determinada região e também auxiliando na caracterização genética do agente (SAINZ et al., 2015 e AGUIAR et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi analisar, por meio da técnica de PCR para os genes 16S rRNA, gp19 e gp36, a ocorrência da infecção natural por *E. canis* em cães do Distrito Federal e analisar as principais alterações laboratoriais ocasionadas por esta infecção.

2.0 Material e Métodos

2.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília registrado com o protocolo de nº 130988/2015.

2.2 Colheitas das amostras

Foram incluídos no estudo 206 cães que não apresentavam sintomatologia clínica evidente para hemoparasitoses, escolhidos por conveniência e aleatoriamente, independentes de raça, idade e sexo, daqueles atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos localizados nas cidades do entorno do Distrito Federal no período de Janeiro de 2017 a Junho de 2020. O número de animais para o estudo foi baseado no cálculo de estimativa do tamanho da amostra com delta igual a 5.

A colheita do sangue foi realizada por meio da venopunção jugular, safena ou cefálica, de acordo com o porte do cão. Foram obtidos cerca de 4 mL de sangue armazenados em tubos com anticoagulante (EDTA) e em tubos com ativador de coágulo mantidos sob refrigeração de 4 a 8°C até o início do processamento. O tempo entre a colheita e a análise não foi superior a 6 horas.

2.3 Análises das Amostras

2.3.1 Análises hematológicas e bioquímicas

As amostras armazenadas em tubos com EDTA foram utilizadas para a realização do hemograma, utilizando o contador semiautomático de células (ABC Vet®- Horiba ABX diagnostics, Brasil). Os valores do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Por meio da técnica do microhematócrito determinou-se o volume globular (VG); aqueles animais que apresentavam VG menor que 37% foram considerados anêmicos, as proteínas plasmáticas totais foram determinadas com o auxílio do refratômetro (JAIN 1993). A pesquisa de hemoparasitas foi realizada mediante a leitura por microscopia ótica do esfregaço sanguíneo corado pelo método de Panótico (NewProv®, Brasil). A

contagem de plaquetas foi conferida no esfregaço sanguíneo.

As amostras acondicionadas em tubos com ativador de coágulo foram centrifugadas a 3500rpm por 5 min para obtenção de soro, utilizado nas análises bioquímicas. Foram determinadas as concentrações da ureia (UR), creatinina (CREAT), proteína total (PT), albumina (ALB), e as atividades enzimáticas da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), em um analisador automático (Cobas c111®, Roche Diagnóstica do Brasil, São Paulo).

2.3.2 Ensaio Molecular

Os ensaios moleculares foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB).

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras armazenadas sob refrigeração em tubos com EDTA utilizando kit comercial (Blood Genomicprep, GE Health Care®) de acordo com as orientações do fabricante. Após a realização das extrações, todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R (BIRKENHEUER et al. 2003) com a finalidade de verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da PCR. A mistura da PCR para o GAPDH foi composta de tampão 10X, 2µL de DNA, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo a 25mmol (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A mistura da PCR para a *E. canis* foi composta de tampão 10X, 0,75 µl de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1 µl de DNA, 0,2 µl de cada deoxinucleotídeo a 25mmol (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil I), 1µl de cada oligonucleotídeo a 10pmoles e 0,2µl de Taq DNA polimerase a 5U/µl (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para o volume final de 25µL foi acrescido de água miliQ. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de

desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 63°C por 2 minutos e 72°C por 90 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, apenas as amostras positivas para o gênero *E. canis* foram submetidas as PCRs para os genes da gp19 e gp36 (Tabela 1). A reação de PCR para a gp 19 foi composta de tampão 10X, 1,25µl de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5µl de DNA, 0,2 µl de cada deoxinucleotídeo a 25mmol (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil I), 1µl de cada oligonucleotídeo a 10pmoles e 0,2µl de Taq DNA polimerase a 5U/µl (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para o volume final de 25µL foi acrescentado de água miliQ. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial 1 ciclo de desnaturação inicial (3 min, 94°C); seguido por 35 ciclos de desnaturação (1 min, 94 °C), anelamento (1 min, 55°C) e extensão inicial (1:30 min, 72°C) e um ciclo de extensão final (5 min, 72°C) (CHEN et al., 2010). A mistura da PCR para a gp36 foi composta de tampão 10X, 1,25µl de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 2µl de DNA, 0,2 µl de cada deoxinucleotídeo a 25mmol (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil I), 3µl de cada oligonucleotídeo a 10pmole e 0,2µl de Taq DNA polimerase a 5U/µl (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para o volume final de 25µL foi acrescentado de água miliQ: O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa ciclo de desnaturação inicial (95 ° C por 5 min); seguidos por 35 ciclos de desnaturação (95° C por 30 s), anelamento (57° C por 30 s), extensão inicial (72°C por 1 min) e 1 ciclo de extensão final (72°C por 5min) (AGUIAR et al., 2014).

As amostras positivas para *E. canis* foram submetidas a cPCR para identificação de co-infecções com piroplasmídeos e com agentes da família *Trypanosomatidae*. Para verificar a presença da ordem *Piroplasmida* foi utilizado um ensaio de cPCR visando o gene 18S rRNA (JEFFERIES et al., 2007). Para a identificação da *Trypanosomatidae* foram utilizados os oligonucleotídeos com o domínio polimórfico D7 do gene RNA24S alfa ribossomal D75 e D76 (FERREIRA et al, 2015).

Todas as reações da PCR foram realizadas em duplicata, no mesmo termociclador BioRad C100 Thermal Cycler utilizando como controle negativo água ultra pura miliQ autoclavada, e como controle positivo, amostras de DNA de animais naturalmente infectados por *E. canis* ou de cultivo celular para as glicoproteínas do

agente.

Tabela 1. Oligonucleotídeos, genes alvos e tamanhos dos produtos de PCR utilizados para detecção de *Ehrlichia canis*, GP19, GP36 e a enzima GAPDH.

Gene	Sequencias dos Oligonucleotídeos (‘5-3’)	Especificidade	Fragmento	Referências
16S rRNA	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATA GGA TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCT A	<i>E. canis</i>	396 pb	(Murphy et al., 1998)
18S rRNA	GGCTCATTACAACAGTTATAG CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC	<i>Piroplasmida</i>	830pb 790 pb	Jefferies et al., 2007)
	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC GGACTACGACGGTATCTGATCG			
24S rRNA	GCAGATCTTGGTTGGCGTAG GGTTCTCTGTTG CCCCTTTT	<i>Trypanosomatida</i> e	295 pb	FERREIRA et al, (2015)
GP- 36	TTTAAAACAAAATTAACACACTA AAGATTA ACTTAATACTCAATATTA CT CACACTAAAATGTATAATAAAGC	Glicoproteína 36	800 a 1000 bp	(Aguiar et al., 2013)
GP-19	ATTAGTGTGTTGGTTATG CAA TACGCTTGCTGAATATCATGA	Glicoproteína 19	414pb	(Chen et al., 2010)
GAPDH	CCTTCATTGACCTCAACTACAT CCAAAGTTGTCATGGATGACC	GAPDH Mamíferos	400pb	(BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT , 2003)

GAPDH = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

GP= Glicoproteína.

Os produtos das PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados em brometo de etídio (Vetec Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) e visualizados com iluminação ultravioleta por meio de transiluminador (UV transiluminator®, UVP LLC, Upland,32 CA).

Os produtos da PCR com tamanho esperado para os genes *gp36* e *gp19* foram purificados utilizando o kit Nucleospin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel) conforme recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram

sequenciadas pelo método de Sanger. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em ambas as direções utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 1. As sequências foram editadas utilizando o programa CLC Genomics WorkBench v8.0 (POSADA; CRANDALL, 1998). A ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) foi usada para avaliar a identidade do gp19 com sequências de nucleotídeos de *E. canis* disponíveis no GenBank e o programa PopART v.1.7 para desenhar a rede de haplotipos.

3.0 Análise Estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste Mann-Whitney foi utilizado para a análise, pois todos os dados apresentavam distribuição não paramétrica e também para comparar as médias das variáveis quantitativas entre os animais infectados e não infectados. Essas variáveis foram apresentadas na forma de média e desvio-padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Microsoft Excel para Windows 2010 e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

4.0 Resultados

Foram analisadas amostras de sangue total de 206 cães domiciliados de Brasília e de abrigos localizados no entorno do Distrito Federal, sendo 98 machos e 108 fêmeas, de raças variadas. Na pesquisa direta no esfregaço sanguíneo realizado durante o diferencial morfológico das 206 amostras apenas em um animal (Identificado: **E8**) foi observado a presença de *Hepatozoon* spp.

Os ensaios de PCR para os 206 cães, utilizando os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R para confirmação do gene que codifica a enzima nos mamíferos resultou em fragmentos com 400 PB em todos os cães.

As amostras submetidas à cPCR para o gene 16S rRNA específico para *E. canis* resultaram em 14 (6,79%) amostras positivas. Os ensaios moleculares para o gênero *Babesia* e para a família *Trypanosomatidae* demonstram que apenas uma amostra foi positiva para *E. canis* e *Babesia* spp. Os resultados das análises dos hemogramas e bioquímicos dos animais positivos na cPCR para *E. canis* estão apresentadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Valores obtidos dos hemogramas dos cães positivos na cPCR para *E. canis* do Distrito Federal e entorno atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos.

	Média	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana	Valores de referências
Eritrograma					
Volume globular (%)	40	25	54	38	37-55
Hemoglobina (g/dl)	13,4	8,2	18,9	13,1	12-18
Eritrócitos	5,85	3,61	7,49	5,67	5,5-8,5
VCM	67	60	72	69	60-77
CHCM	34	32	37	34	32-36
Leucograma					
Leucócitos Totais (10 ³ /μL)	9.15	5.3	13.9	9.5	9.0-16.0
Neutrófilos	5.516	2.438	9.174	5.292	4.050-11.520
Linfócitos	2.563	1.425	3.682	2.392	1.800-7.680

Eosinófilos	693	190	1.734	636	180-1.600
Monócitos	359	95	855	288	180-1.600
Plaquetas (µl)	206.000	20.000	359.000	214.000	200.000- 600.000
Proteína Plasmática Total (g/dL)	7,80	6,4	9,6	7,5	6,0-8,0

VCM – Volume Corpúscular Médio

CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 3. Valores obtidos na bioquímica sérica dos cães positivos na cPCR para *E. canis* do Distrito Federal e entorno atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, em Clínicas Veterinárias de Brasília e de abrigos.

Bioquímicos	Média	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana	Valores de referências
Alanina aminotransferase (UI/L)	59	17	294	27	21-73
Fosfatase alcalina (UI/L)	80	48	157	65	20-156
Ureia (mg/dL)	33	23	46	30	21,4-57,92
Creatinina (mg/dL)	0,91	0,7	1,1	0,9	0,5-1,5
Proteína total (g/dL)	7,11	6,1	8,6	7,1	5,4-7,10
Albumina (g/dL)	3,15	1,8	4,4	3,2	2,60-3,30

Não houve diferença ($p > 0,05$) na comparação entre os resultados laboratoriais dos animais positivos e negativos para a infecção por *E. canis* (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Média e desvio padrão dos valores hematológicos dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da cPCR para *E. canis*.

	Infectados	Não infectados	Valor P	Valores referência
Eritrograma				
Volume Globular (%)	40 ± 9,0	42,6 ±9,1	0,18	37-55
Hemoglobina (g/dl)	13,4 ± 3,08	14,9 ±3,21	0,16	12-18
Eritrócitos	5,85 ± 1,2	6,27 ±1,34	0,20	5,5-8,5
VCM	67 ± 3,7	68 ±3,91	0,60	60-77
CHCM	33,9 ±1,24	34,1 ±1,57	0,62	32-36
Leucograma				
Leucócitos Totais (10 ³ /μL)	9.33 ± 3,2	10.9 ± 5.5	0,29	9.0-16.0
Segmentados	5.632± 3033	7.059 ±4.174	0,10	4.050-11.520
Linfócitos	2.547 ± 1.047	2.295 ± 1.743	0,14	1.800-7.680
Eosinófilos	726±543	851±754	0,74	180-1.600
Monócitos	418 ± 243	693 ± 722	0,10	180-1.600
Plaquetas (μl)	195 ± 135	269 ± 125	0,08	170.000-600.000
Proteína Plasmática	7,8 ± 1,1	7,1 ± 1,2	0.04	6,0-8,0
Total				

VCM – Volume Corpúscular Médio

CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

Tabela 5. Média e desvio padrão da bioquímica sérica dos grupos de animais infectados e não infectados de acordo com os resultados da cPCR para *E. canis*.

Bioquímicos	Infectados	Não infectados	Valor P	Valores de referência
Alanina aminotransferase (UI/L)	59 ± 95,2	49,19 ± 52,7	0,059	21-73

Fosfatase alcalina (UI/L)	80,2 ± 36,5	102 ± 202,3	0,077	20-156
Ureia (mg/dL)	33 ± 9,8	42,5 ± 35,1	0,32	21,4-57,92
Creatinina (mg/dL)	0,91 ± 0,13	1,0 ± 1,0	0,63	0,5-1,5
Proteína total (g/dL)	7,1 ± 0,77	6,7 ± 1,3	0,25	5,4-7,10
Albumina (g/dL)	3,1 ± 0,74	3,2 ± 0,73	0,49	2,60-3,30

Dos 14 cães testados positivos para *E. canis*, cinco (35,7%;P=0,003) apresentavam anemia normocítica normocrômica, sete (57,2%;P=0,002) apresentavam trombocitopenia e dois (14,3%;P=0,03) tinham leucopenia (Tab. 6). Os valores hematológicos dos cães positivos com anemia, trombocitopenia e ou leucopenia estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 6. Dados da frequência de cães negativos e positivos para *E. canis* em relação as anormalidades hematológicas.

<i>E. canis</i>	Anemia		Leucopenia		Trombocitopenia	
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Negativo	49 (25,5%)	143 (74,5%)	15 (7,8%)	177 (92,2%)	57 (29,6%)	135 (70,4%)
Positivo	05 (35,7%)	09 (64,3%)	02 (14,3%)	12 (85,7%)	08 (57,2%)	06 (42,8%)
Total	152	54	17	189	141	65

Tabela 7. Valores do VG, plaquetas e leucócitos dos animais positivos para *E. canis* com alterações laboratoriais.

ID	VG (%)	Plaquetas (/µl)	Leucócitos (/µl)
E1	42	176.000	4.900
E2	36	272.000	13.800
E3	36	359.000	5.300
E4	36	135.000	10.200
E5	47	135.000	8.000
E6	37	159.000	9.500

E7	25	56.000	13.900
E8	23	20.000	14.900
E9	40	67.000	7.100
E10	48	67.000	7.200

ID= Identificação do animal; VG = Volume Globular.

As amostras positivas na cPCR para o gene 16S-rRNA específico para *E.canis* submetidas a cPCR para os genes das glicoproteínas, resultaram em 100% (n=14/14) e 28,6 (n=4/14) para gp19 e gp36, respectivamente. Na tabela 10 estão apresentados os valores hematológicos dos animais positivos para as glicoproteínas testadas e os resultados nas cPCR realizadas.

Tabela 8. Principais dados hematológicos dos cães naturalmente infectados por *E. canis*, diagnosticados por meio da PCR e positivos para as glicoproteínas 19 e 36.

ID	VG (%)	Plaquetas (/μl)	Leucócitos (/μl)	PCR <i>E. canis</i>	PCR GP19	PCR GP36
E1	42	176.000	4.900	+	+	-
E2	36	272.000	13.800	+	+	+
E3	36	359.000	5.300	+	+	-
E4	36	135.000	10.200	+	+	-
E5	37	159.000	9.500	+	+	-
E6	25	56.000	13.900	+	+	-
E7	23	20.000	14.900	+	+	-
E8	40	67.000	7.100	+	+	+
E9	48	67.000	7.200	+	+	+
E10	53	270.000	15.500	+	+	+
E11	39	286.000	7.200	+	+	-
E12	47	135.000	8.000	+	+	-
E13	54	318.000	6.200	+	+	-
E14	37	420.000	8.700	+	+	-

ID= Identificação do animal; VG = Volume Globular.

Quatro amostras da cPCR positivas para a gp36 e uma única amostra da gp 19 foram submetidas ao sequenciamento genético. Das quatro amostras amplificadas para o gene gp36 sequenciadas nenhuma resultou em produtos com qualidade que propiciasse análises. Os resultados preliminares da análise da sequencia parcial do gene gp19 da amostra única demonstraram no BLASTn 100%

de identidade com 100% de cobertura com sequências de *E. canis*.

No alinhamento múltiplo a identidade entre os isolados variaram de 98,92% a 100% (Fig. 3). A análise do genótipo baseado em sequências depositadas no Genbank, incluindo a amostra obtida neste estudo, mostrou a presença de 10 haplótipos (H), com $\pi = 0,00538$, $hd = 0,705$ e $K = 2,184$, pb 400 e com 14 sítios segregantes. A sequência obtida no presente estudo (Seq) agrupou-se com outros isolados brasileiros no Haplótipo (H1) juntamente com sequências dos Estados Unidos e Tailândia (Fig.4). A nível de aminoácido os haplótipos H1 e H2 compartilharam 100% de identidade; os haplótipos H3 e H1 a identidade foi de 93,2%; H4 e o H1 a identidade é de 99,2. H5 e H1 identidade de 99,2%. H6 e H1 identidade de 98,4%. Os haplótipos H7,H8, H9 e H10 compartilharam com H1 97,6% de identidade.

Figure 4. . Rede de TCS da sequência do gp19- *E.canis* obtida no Distrito Federal e entorno.

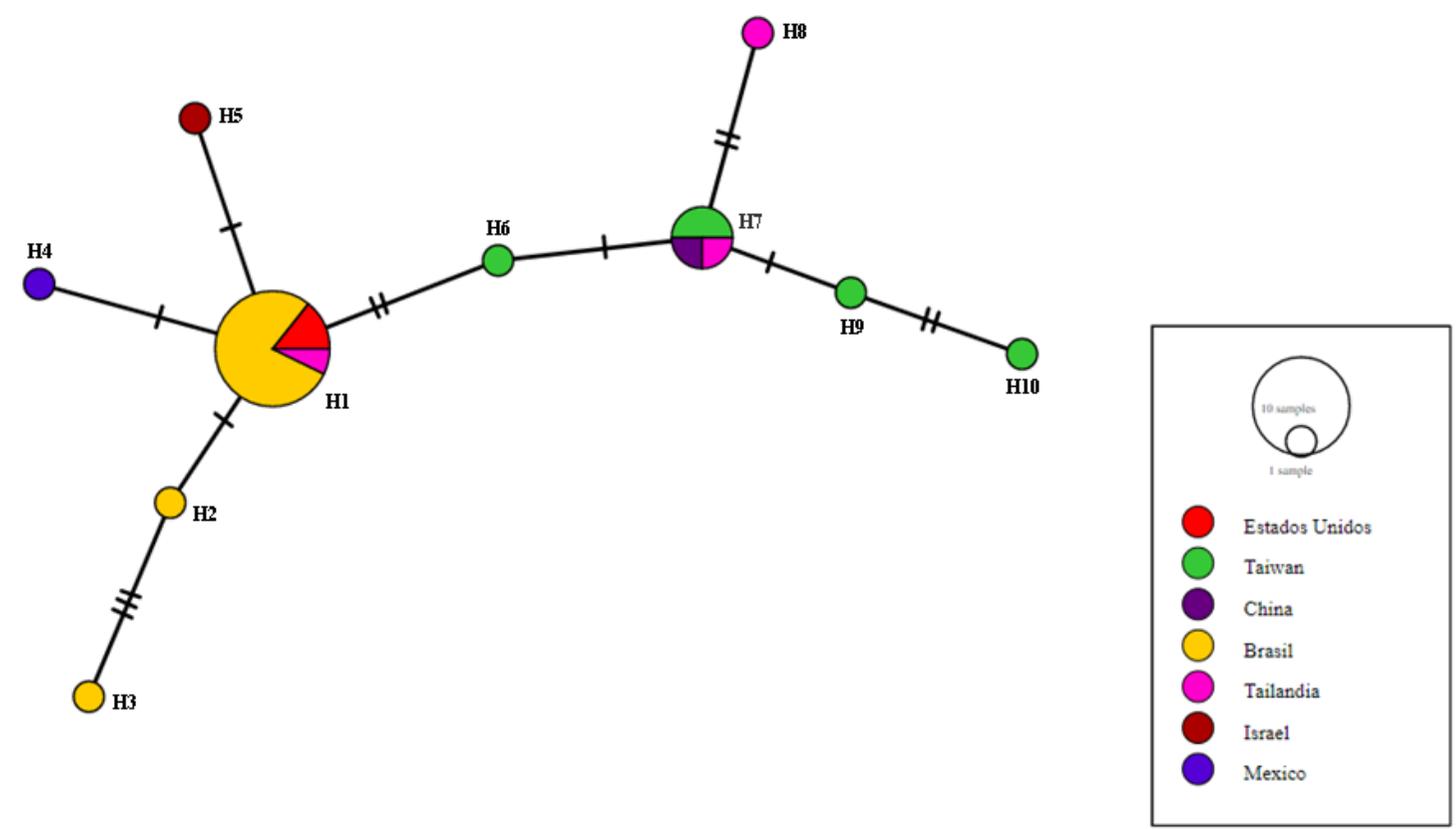


Figure 5. Sequências parciais da gp 19 a nível de aminoácido de *E. canis* alinhadas, evidenciando as mutações entre os isolados e grupos de haplótipos.

Região e Nº de Acesso	Haplótipo	3	24	35	50	73	88	89	108	124
1. Brasil (MG584540.1)	H1
2. Brasil (MG584541.1)	
3. Brasil (MG584542.1)	
4. Brasil (MG584539.1)	
5. Brasil (MG584543.1)	
6. Tailândia (MF771088.1)	
7. Estados Unidos (DQ858221.1)	
8. Brasil (MG584544.1)	
9. Brasil (KF233415.1)	
10. Brasil (presente estudo)	
11. Estados Unidos (CP000107.1)	
12. Brasil (KY522828.1)	
13. Brasil (KY522829.1)	
14. Brasil (KF233419.1)	
15. Brasil (KF233417.1)	H2
16. Brasil (KF233425.1)	H3	F	L	.	.
17. México (DQ858226.1)	H4	.	D
18. Israel (EU118959.1)	H5	.	.	G
19. Taiwan (EU375365.1)	H6	Y
20. Taiwan (EF587270.1)	H7	Q	C	Y
21. China (CP025749.1)		C	Y
22. Tailândia (MF771086.1)		C	Y
23. Taiwan (EF560598.1)		C	Y
24. Tailândia (MF771087.1)		H8	Q	.	.	.	S	.	.	C
25. Taiwan (EU178795.1)	H9	Q	C	Y
26. Taiwan (EU178796.1)	H10	Q	.	.	R	.	.	.	C	Y

5.0 Discussão

As ferramentas tradicionais de diagnóstico da EMC abrangem a pesquisa do hemoparasita no esfregaço sanguíneo por meio da microscopia óptica, sorologia, porém atualmente, para o diagnóstico definitivo é utilizado técnicas moleculares. No presente estudo, por meio da PCR, foram analisadas 206 amostras de sangue de cães assintomáticos que viviam em diferentes regiões e condições do Distrito Federal e entorno, resultando em 6,79% (14/206) positivas para o gene 16S rRNA de *E. canis*.

A ocorrência de animais infectados com *E. canis* neste estudo diferiu de pesquisas anteriores realizadas na região do DF. Cesar M. (2008) detectou 27,9% de animais positivos para *E. canis* dentro de um grupo de animais selecionados por apresentarem sinais clínicos sugestivos das fases clínicas da infecção por *E. canis*, também difere do estudo de Labarthe et al. (2007) os quais relataram a prevalência de 27,8% de *E. canis* no Distrito Federal, com 24 dos 101 cães positivos testados por métodos sorológicos. Peixoto C. (2019) observou o percentual de 27,3 na amostragem de cães que apresentavam sinais clínicos oftálmicos e com alterações em hemograma de anemia e trombocitopenia.

Cabe salientar que este é o primeiro estudo da região do Distrito Federal e entorno que os animais testados por cPCR não apresentavam sintomatologia clínica evidente, representando assim o cenário da ocorrência de cães com a infecção por *E. canis*. Peixoto C. (2019) e Cesar M. (2008) designaram a amostragem por alterações clínicas decorrentes da infecção, desta maneira podem superestimam a ocorrência do agente na região estudada. A ocorrência de *E. canis* encontrada neste estudo também pode ser explicada pela técnica de diagnóstico, a PCR, quando realizada em amostras sangue periférico é tida como menos sensível quando comparada com a PCR de amostras baço de cães que apresentam baixa carga bacteriana (MYLONAKIS. et al. , 2009). Os cães com EMC podem permanecer longos períodos sem apresentar alterações clínicas laboratoriais, considerado a fase subclínica, nesses casos o diagnóstico é limitado devido à baixa parasitemia e as poucas manifestações clínicas.

A faixa etária dos animais positivos neste estudo foi predominantemente adulto, este fato pode ser explicado, pois a maioria dos animais incluídos não apresentavam sinais clínicos da fase aguda da infecção como descrito por Harus et al., 2012, como a apatia, anorexia, vômito, esplenomegalia, sugerindo assim

possíveis casos de infecção crônica ou subclínica, contudo deve-se levar em consideração que a amostragem apresentava um alto percentual de cães adulto.

Foi observada maior ocorrência 71,4% (10/14) de cães positivos sem raça definida, este fato pode ter corrido devido ao grupo amostrado, pois grande parte dele era composta por animais de abrigos. Apesar de ser relatado que cães da raça Pastor Alemão são mais sensíveis à infecção, e que os cães sem raça definida e os Beagles apresentam maior resistência à forma clínica (HARRUS et al., 1997; NYINDO et al., 1980), outros estudos não observaram associação entre as raças e a infecção (SILVA et al., 2010; SAILTO et al., 2008; CARLOS et al., 2011).

A pesquisa direta no esfregaço sanguíneo reafirma a hipótese de que os animais se encontravam na fase crônica ou subclínica no momento do diagnóstico, pois não foram visualizadas as mórulas em células mononucleares que é consistente com infecções induzidas durante a fase aguda da doença (HARRUS & WANER, 2012). Ainda que a pesquisa direta seja um método de baixo custo e de fácil execução, apresenta baixa sensibilidade decorrente do grau de parasitemia e da fase clínica da infecção e da resposta imunológica do animal frente à infecção (CHAPMAN et al., 2006).

Os achados laboratoriais comumente associados à EMC variam conforme a fase clínica, a parasitemia e a própria resistência do animal. Com relação aos parâmetros hematológicos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os cães com ou sem a infecção, apesar da trombocitopenia ter sido o achado mais consistente entre os animais infectados ($P = 0,002$). Este trabalho corrobora com Bulla et al., (2004) que indicam a contagem plaquetária como teste de triagem para EMC, e que a intensidade da trombocitopenia pode aumentar a confiabilidade dos testes diagnósticos. Ressalta-se que 21,3% dos cães deste estudo são animais que buscaram atendimento em decorrência de diversas patologias ou para castrações no hospital veterinário da Universidade de Brasília.

Entre os cães positivos para a infecção 43% (6/14) apresentavam trombocitopenia severa e 14,2% (2/14) exibiam plaquetas no limite inferior da referência (200.000/ μ l) para a espécie (Tab. 9), estes dados assemelham-se a outros pesquisadores (HARRUS, S., & WANER, T. 2011). Herrera C. et al., (2020) relataram a presença de trombocitopenia em 38,8% dos cães com *E. canis*. Bulla et al. (2004) descreveram sobre a trombocitopenia e a infecção por *E. canis*, sugerindo que animais trombocitopênicos sejam testados para Erliquiose. É possível detectar a

trombocitopenia nas três fases clínicas da infecção, decorrente da lesão inflamatória no endotélio vascular devido ao consumo, sequestro ou destruição imunomediada pelo sistema monocítico fagocitário (BULLA et al., 2003). Vale enfatizar que neste estudo a população amostral era composta por animais sem sinais clínicos evidentes e a trombocitopenia é mais evidente nos animais durante as fases aguda e crônica (GAUNT S. et al., 2010; HARRUS, S., & WANER, T. 2011).

A anemia, ou seja, a diminuição das hemácias, hemoglobina e ou hematócrito, geralmente é uma manifestação secundária a uma doença e é um dos principais achados laboratoriais associados à erliquiose (CARLOS et al., 2011 e SAINZ A. et al., 2015). Neste estudo (Tab. 6) não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os cães com ou sem a infecção, porém, a frequência da anemia normocítica normocrômica (Tab. 8) foi de 35,7% ($P = 0,003$) nas amostras positivas para *E. canis*. O resultado deste estudo apresenta relação para a infecção por *E. canis* e a anemia como encontrado nos estudos de BORIN S. et al., (2009) e HARRUS et al., (1997). Os mecanismos responsáveis pela anemia na EMC estão associados ao sistema monocítico-fagocitário, pela ação do sistema complemento e a supressão da medula óssea (SHROPSHIRE et al., 2020; WALDEMARIN et al., 2003; BORIN, 2009).

O número de leucócitos totais também não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Porém quando analisados a frequência de leucopenia entre os animais positivos e negativos para infecção por *E. canis* é possível observar que o grupo de animais positivos apresentou maior porcentagem de leucopenia (14,3%, Tabela 8). As variações de leucograma durante a infecção podem ser relativamente leves e difíceis de serem detectados em um ambiente clínico, porém a diminuição dos leucócitos é comumente encontrada durante a subclínica e crônica da infecção. (WANER et al., 1996; HARRUS, S., Waner, T. 2011 e VIERIA et al., 2011).

Os parâmetros da bioquímica sérica não apresentaram diferença estatística entre os animais positivos e negativos para erliquiose e também não houve ocorrência das alterações dos perfis bioquímicos entre os infectados e não infectados. Considerando os parâmetros analisados neste estudo, observa-se que os animais não sofreram alterações significativas ao nível renal e hepático, o que indica pouco envolvimento do agente nos órgãos, ou mesmo a fase da doença em que se encontravam. Cabe ressaltar que alguns animais alocados no grupo de não

infectados apresentaram alterações nas enzimas hepáticas, proteína total e albumina, porém um dos principais fatores limitantes para as análises laboratoriais sobre do efeito da infecção entre os grupos é a ausência do histórico clínico dos animais alocados no estudo.

Apenas um animal apresentou coinfeção por *Babesia* spp. e por *Hepatozoon canis*. Essas coinfeções são relatadas em outros trabalhos e ocorrem porque esses patógenos compartilham o mesmo vetor (RAWANGCHUE T, SUNGPRADIT S. 2020 e ROJAS A. et al., 2014). Neste animal foram observadas alterações laboratoriais mais exacerbadas, com anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia severa, estudos anteriores afirmam que as coinfeção aumentam a gravidade das alterações laboratoriais devido aos mecanismos como hemólise. (RAWANGCHUE T, SUNGPRADIT S. 2020 e ROTONDANO T. et al., 2015).

Há vários estudos baseados em diferentes genes alvo como exemplo: 16S rRNA, p28, p30, dsb, no entanto, o 16S rRNA e os ensaios de PCR baseados em p30 são mais comumente usados e demonstram maior sensibilidade (STICH et al., 2002). As técnicas usadas para o diagnóstico no presente estudo apresentam divergência entre si, porém, o uso da PCR com alvo para o gene de proteínas de membrana gp19 mostrou eficiência de 100% quando comparada com o gene 16S rRNA diferentemente da técnica da pesquisa no esfregaço sanguíneo, este resultado corrobora com outros estudos desenvolvidos no Brasil (COSTA R. 2018 e FERREIRA et al., 2014).

A análise da sequência parcial da amostra amplificada do gene gp19 do Distrito Federal apresentou-se altamente conservado, este resultado foi semelhante aos isolados encontrados no Rio de Janeiro (Ferreira et al., 2014 e Costa R. 2018). A rede de haplótipos evidenciou que os isolados com maior identidade entre si agrupam-se em haplótipos filogeograficamente mais próximos.

A sequência do gene que codifica a glicoproteína da amostra deste estudo depositada no GenBank mostrou um elevado grau de identidade com sequências brasileiras e das américas (Fig. 3). A identidade dos isolados brasileiros demonstrou certo grau de diversidade intraespecífica entre eles. Embora seja um marcador conservado, identificou-se a presença de três haplótipos brasileiros, com a maior parte dos isolados pertencentes ao haplótipo H1, contituído também por sequências os Estados Unidos e da Tailândia (Fig. 4).

Os haplótipos H1 e H2 não apresentaram divergência a nível de aminoácido

entre si, diferentemente em relação ao H3 que possui quatro mutações não sinonímias na sequência KF233425 (haplótipo H3) levando a substituição de tirosina (Y) para uma fenilalanina (F) na posição 88 e de uma glutamina (Q) para uma leucina (L) na posição 89 (Fig.5). Doyle et al. (2005) propuseram que a proteína gp19 poderia ser uma boa candidata para ensaios sorológicos, e, os resultados deste trabalho corrobora que esse gene também pode ser um excelente marcador para os ensaios moleculares devido ao grau de identidade e percentagem de animais positivos. Aguiar et al.(2013) encontraram elevado grau de identidade em estudo das cepas nas cinco regiões do Brasil e observaram a tendência de agrupamento entre as sequências brasileiras.

Na análise do gp36 apenas 28% (4/14) das amostras apresentaram amplificação. Cabe salientar que esta região é conhecida por sofrer pressão seletiva para adaptação da bactéria ao hospedeiro (ZGANG et al., 2008). Doyle et al. (2006) destacaram que a gp36 é expressa no início do ciclo do desenvolvimento da *E. canis*, células densamente coradas (CD), indicando que as proteínas são liberadas extracelularmente durante a infecção, reafirmando a hipótese de que os animais deste estudo encontravam-se na fase crônica ou subclínica no momento do diagnóstico.

Com estes resultados também se deve levar em consideração a eficácia dos oligonucleotídeos para a gp36 utilizados neste estudo, o número de animais alocados no estudo e, sobretudo a influência das temperaturas de anelamento do protocolo de PCR realizado. Apesar dos achados do presente trabalho, estudos futuros são necessários para avaliar a ocorrência e variabilidade do gene na *E. canis* presentes no Distrito Federal e entorno.

6.0 Conclusões

Os resultados do presente estudo demonstram a baixa ocorrência de *E. canis* no Distrito Federal e entorno em cães sem sintomas clínicos para hemoparasitose. As alterações hematológicas como anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia foram encontradas nos animais positivos mesmo na ausência de sinais clínicos. A boa relação entre o gene que codifica a proteína de superfície gp19 e o gene 16S rRNA pode ser indicativo para o uso de novos oligonucleotídeos na rotina clínica. A utilização do gene que codifica a proteína de superfície gp36 como método diagnóstico e para análise filogenética apresenta limitações, estes achados apontam a necessidade de estudos futuros para estabelecer a variabilidade e a frequência da *E. canis* no DF e entorno com a utilização de sequenciamento, e novos protocolos de diagnósticos.

7.0 Referências Bibliográficas

AGUIAR, D.M.; ZHANG, X.; MELO, A.L.T.; PACHECO, T.A.; MENESES, A.M.C.; ZANUTTO, M.S.; HORTA, M.C.; SANTARÉM, V.A.; CAMARGO, L.M.A.; MCBRIDE, J.W.; LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.315-321, 2013.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4172-7, Sep 2003.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.

BULLA,C.;TAKAHIRA,R.K.,ARAUJO,JR.,J.P.,TRINCA,L.A.,LOPES,R.S.,WIEDMEY ES,C.E. The relationship between degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet Res**, n.35,n.35,p.1441-146,2004.

CARLOS, R.S.A.et al.Risk factos and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.20, p. 210-214, 2011.

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.

CHAPMAN AS, BAKKEN JS, FOLK SM, PADDOCK CD. Diagnosis and management of tickborne Rickettsia I diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis—United States: A practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **MMWR Recomm Rep**.v. 55.p.1–27. 2006.

CHEN, Y.H.; LEE, C.C.; TSANG, C.L.; CHUNG, Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.70-75, 2010.

COSTA, RENATA LINS. **Molecular characterization of *Ehrlichia canis* using genes *gp19*, *gp36* and *p28*, from the dogs of Rio de Janeiro state**. 2018. 33p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

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, n.4, p.504-510, 2005.

DOYLE C. KUYLER, KIMBERLY A. NETHERY, VSEVOLOD L. POPOV, JERE W. MCBRIDE. 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, 2006.

DUMLER, J. STEPHEN; BARBET, ANTHONY F.; BEKKER, CORNELIS P. J.; DASCH, GREGORY A.; PALMER, GUY H.; RAY, STUART C.; RIKIHISA, YASUKO; RURANGIRWA, FRED 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. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**.v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; CASTRO, T.X.; FERREIRA, E.O.; NEVES, F.P.G.; BARBOSA, A.V.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.P. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Braz. Parasitol. Vet.** v.23, n.3, p.301-308, 2014.

GAUNT S, BEALL M, STILLMAN B, LORENTZEN L, DINIZ P, CHANDRASHEKAR R, BREITSCHWERDT E. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasit Vectors**.v.8 p.:33.2010.

HARRUS S, WANER T, NEER TM. *Ehrlichia canis* infection. In: Greene CE (edit.). **Infectious diseases of dogs and cats**. Elsevier, Missouri. p. 227-238, 2012.

HARRUS S, I AROCH, E LAVY AND H BARK. Clinical manifestations of canine cyclic thrombocytopenia. **Vet Rec**, v. 141, p. 247-250. 1997.

HARVEY JW. Thrombocytotropic anaplasmosis (*A.platys* [*E.platys*] infection). In: Greene CG, editor. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd ed. St. Louis: Saunders Elsevier; p. 229–31. 2006.

JAIN, N.C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea &Febiger, 1993. 417p. Labruna, M.B.;PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.20, p. 24-32,2001.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]. Disponível em: <<http://www1.ibge.gov.br/>> [2021 mai 20].

JEFFERIES, R., RYAN, U.M., IRWIN, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Vet. Parasitol**. v.144,p. 20–27. 2007.

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

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**, v.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, 1998.

MYLONAKIS, MATHIOS; HARRUS, SHIMON; B.BREITSCHWERDT, Edward. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The Veterinary Journal**, [s. l], v. 246, p. 45-53, abr. 2019.

NYINOD, M.; HUXSOLL, D.L; RISTIC, M.;KAKOMA, I.;BROWN,J.L.; CARSON,C.A.;STEPHENSON, E.H.Cell-mediated and humoral reponses of German Shepherd dogs and Bleagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p. 250-254, 1980.

RAWANGCHUE T, SUNGPRADIT S. Clinicopathological and molecular profiles of *Babesia vogeli* infection and *Ehrlichia canis* coinfection. **Vet World**. v.13(7)p.1294-1302. 2020.

ROJAS A, ROJAS D, MONTENEGRO V, GUTIÉRREZ R, YASUR-LANDAU D, BANETH G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. **Vet Parasitol** v. 31. p.199(3-4). 2014.

ROTONDANO T., ALMEIDA H., KRAWCZAK F., SANTANA V., VIDAL I., LABRUNA M., AZEVEDO S., ALMEIDA A., MELO M. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Rev. Bras. Parasitol.** Vet.v.24 2015.

SAINZ, A., X. ROURA, G. MIRO, A. ESTRADA-PENA, B. KOHN, S. HARRUS, and L. SOLANO-GALLEGO. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasit Vectors** 8: 75. 2015

SAITO, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platy* and *Babesia* spp. In dogs from Ribeirão Preto, Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n.1, p. 102-108, 2008.

SEIDE-PEIXOTO, Cristiane. **Alterações oculares e hematológicas em cães acometidos por *Ehrlichia canis* e co-infecções**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2019, 65p.

SILVA, J.N. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-E em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.19, p.108-111, 2010.

SHROPSHIRE S., S DOW, M LAPPI. Detection and dynamics of anti-platelet antibodies in thrombocytopenic dogs with and without idiopathic immune thrombocytopenia. **J Vet Intern Med**, v. 34.p. 700-709. 2020.

STICH, R. W, YASUKO RIKIHISA, S. A. EWING, GLEN R. NEEDHAM, DEBRA L. GROVER and SATHAPORN. Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally Infected Ticks with a p30-Based PCR Assay. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, p. 540–546. 2002.

VIEIRA RFC, BIONDO AW, GUIMARÃES AMS, SANTOS AP, SANTOS RP, DUTRA LH, et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**. V. 20. P.1–12. 2011.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, n. 1, 1996.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.15, n.7, p.1080-1088, 2008.