

IX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA  
GRANDE



PIBIC/CNPq/UFPG-2011

**EVIDÊNCIA SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ERLIQUIOSE CANINA NO MUNICÍPIO  
DE PATOS**

Herta Karyanne Araújo Almeida<sup>1</sup>; Marcia Almeida de Melo<sup>2</sup>

**RESUMO**

A erliquiose é uma das mais importantes enfermidades infecciosas e está distribuída mundialmente. Esta enfermidade acomete caninos, outras espécies domésticas, animais silvestres e o homem, sendo a mais comum entre as infecções transmitidas por carrapatos aos cães. Nos últimos anos, a erliquiose tem sido identificada como causa crescente de morbidade e mortalidade de caninos e, em alguns países, do homem. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por ferramentas sorológica e molecular, a ocorrência da erliquiose canina no município de Patos, Paraíba, Brasil, além de comparar a sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas. Foram analisadas 100 amostras de sangue oriundas de cães domiciliados, escolhidos aleatoriamente. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) detectou 65% de animais positivos, a Reação em Cadeia pela Polimerase convencional (PCRc) 84% e a PCR em tempo real (qPCR) 95%. Apenas um animal foi negativo nos três testes, sendo este, provavelmente, o único animal ainda não exposto à bactéria. Apenas 1 (uma) amostra foi positiva na RIFI e negativa nas técnicas PCR e qPCR, sugerindo a ocorrência de reação cruzada ou de uma fase crônica da infecção, visto que esse animal apresentou titulação 1: 1.280. Um total de 3,57% (3/84) dos animais positivos na PCRc (gênero-específica) foi negativo na qPCR para *E. canis*. Uma das justificativas para este resultado é a possível infecção por outra espécie do gênero *Ehrlichia*. Quando as técnicas PCRc e qPCR foram comparadas para avaliar sensibilidade e especificidade, o índice Kappa apresentou grau de concordância fraco isso pode ser justificado pela capacidade da qPCR em detectar baixas quantidades de DNA e do gene utilizado como alvo ter uma maior número de cópias quando comparado ao da PCRc. Através da associação entre a RIFI, PCR e a qPCR foi possível identificar uma alta porcentagem de animais infectados com *E. canis* (51%).

**Palavras-chave:** Prevalência, diagnóstico, bactéria, Nordeste.

**ABSTRACT**

Ehrlichiosis is one of the most important infectious diseases and is worldwide distributed. This disease affects dogs, other domestic animals, wild animals and humans, being the most common infection transmitted by ticks to dogs. In recent years, ehrlichiosis has been identified as cause of increased morbidity and mortality among dogs and in some countries among the men. This study aimed to evaluate, by serological and molecular tools, canine ehrlichiosis occurrence in the city of

<sup>1</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: hertakaryanne.medvet@gmail.com

<sup>2</sup> Medicina Veterinária, Professora. Doutora, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: marciamelo.pq@cnpq.br. \*Autor para correspondências.

Patos, Paraíba, Brazil, and compared the sensitivity and specificity of the techniques. We analyzed 100 blood samples from canine, chosen randomly. 65% positive animals was detected by Immunofluorescence Assay (IFA), 84% by conventional Polymerase Chain Reaction (PCRc) and 95% by real-time PCR (qPCR). Only one animal was negative in all tests, and probably is the only animal not yet exposed to the bacterium. Only one (1) sample was positive in IFAT and negative by qPCR and PCR techniques, suggesting the occurrence of cross-reaction or a chronic phase of infection, since this animal had final titration of 1,280. A total of 3.57% (3/84) animals were positive in PCRc (genus-specific) was negative by qPCR for *E. canis*. One justification for this result is the probability of infection with other species of *Ehrlichia* genus. When the PCRc and qPCR techniques was compared to evaluate sensitivity and specificity, Kappa coefficient showed poor agreement, explained by qPCR ability to detecting low amounts of DNA and the second gene used as target has high copy number when compared to PCRc. In conclusion, the association among IFT, PCRc and qPCR was identified a high percentage of infected animals with *E. canis* (51%).

**Keywords:** Prevalence, diagnosis, bacteria, Northeast

## INTRODUÇÃO

A erliquiose é causada por bactérias Gram negativas dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Ambos pertencem à ordem *Rickettsiales* e à família *Anaplasmataceae*, e são parasitas intracelulares obrigatórios com ciclo de vida envolvendo hospedeiros invertebrados e vertebrados (DUMLER et al., 2001). A erliquiose monocítica canina (EMC) tem sido relatada em todo o mundo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, causando alta morbidade e mortalidade (BIRCHARD; SHERDING, 2003).

A *E. canis* é um microrganismo Gram negativo, pequeno e pleomórfico, que se replica no citoplasma dos leucócitos circulantes do hospedeiro (CORREA; CORREA, 1992). São observados no interior de monócitos e neutrófilos formando inclusões denominadas de mórula, que medem cerca de 1.0 a 6.0 µm de largura e contém de 1 a 40 organismos. Ao deixar a célula sem rompê-la, cada corpúsculo contido no interior da mórula irá infectar uma nova célula (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Inicialmente, os organismos erliquiais eram classificados de acordo com a célula sanguínea que comumente infectavam (granulócito, linfócito, monócito ou plaqueta), entretanto, este tipo de classificação foi considerada imprópria porque a mesma espécie de *Ehrlichia* pode ser encontrada em outras células que não a sua principal célula-alvo (CDC, 2012).

Dumler et al. (2001), através da comparação das sequências dos genes 16S rRNA e groESL, reclassificaram a família *Anaplasmataceae*. Algumas espécies foram transferidas para o gênero *Anaplasma*: *Anaplasma platys* (antiga *E. platys*), *A. phagocytophilum* (junção entre *E. equi* e *E. phagocytophila*), *A. bovis* (antiga *E. bovis*); outras para o gênero *Neorickettsia*: *Neorickettsia risticii* (antiga *E. risticii*) e *N. sennetsu* (antiga *E. sennetsu*). Por outro lado, a espécie *Cowdria ruminantium* foi inserida no gênero *Ehrlichia*, passando a ser *E. ruminantium*. Atualmente o gênero *Ehrlichia* contempla seis espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*. Uma sexta espécie foi identificada por Kawahara et al. (2004) no Japão, isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, sendo designada como *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*.

Os hospedeiros vertebrados mais comuns são os da família *Canidae* (cães, coiotes, raposa e chagal). Cães em áreas endêmicas e aqueles que são transportados para estas regiões são susceptíveis à doença. Canídeos selvagens podem atuar como reservatórios da *E. canis*, tendo sido demonstrada infecção natural e/ou presença de anticorpos em chagal (*Lycaon pictus*), e experimental em um coioote, com *E. canis* e *Babesia canis* (ALMOSNY et al., 2002), gatos domésticos (OLIVEIRA et al., 2009; ALMOSNY, 1998), gatos selvagens em cativeiro (ANDRÉ et al., 2010) e puma de vida livre (FILONI et al., 2006).

Vários trabalhos indicam *E. canis* como principal agente causador de erliquiose canina no Brasil (AGUIAR et al., 2007; UENO et al., 2009) entretanto, Oliveira et al. (2009) identificaram DNA de *E. ewingii* em cães atendidos na rotina médica, e sugeriram que essa espécie possa também estar envolvida na ocorrência de infecções erliquiais em nosso país, uma vez que já relatos da presença de tal agente no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (MURPHY et al., 1998) principal vetor de *E. canis* e bastante comum no Brasil.

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 o Brasil (DAGNONE et al., 2001). A incidência da doença é mais comum nos meses mais quentes onde há um maior desenvolvimento do carrapato, podendo ser diagnosticada todo o ano.

Segundo Bulla et al. (2004), não existe uma predileção etária para a erliquiose, porém algumas raças são mais susceptíveis à doença, incluindo aquelas que vivem em áreas endêmicas e as que são transportadas para estas regiões (RIKIHISA et al., 1994; DAGNONE et al., 2001; MYLONAKIS et al., 2004). O pastor alemão apresenta uma maior suscetibilidade, mostrando a forma mais severa da doença com alta morbidade e mortalidade quando comparada a outras raças (NYINDO et al., 1980). Vários trabalhos têm demonstrado uma correlação entre idade e a soropositividade para *E. canis*. (COSTA JR et al., 2007; WATANABE et al., 2004; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005). Em relação à associação de sexo ou raça, Watanabe et al., (2004) e Rodriguez-Vivas et al., (2005) não encontraram nenhuma correlação. Sainz (2000) não relatou diferenças entre raças, entretanto, encontrou associação entre a ocupação do cão (cão de guarda ou cão guia) e a soropositividade para *E. canis*.

Em zona rural, poucos estudos têm sido realizados e a epidemiologia da erliquiose canina é pouco conhecida. Em áreas rurais dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, foi observada uma prevalência de 4,8 e 5,94%, respectivamente, por meio de esfregaços sanguíneos (RODRIGUES et al., 2004). Porém, esta prevalência provavelmente está subestimada, já que poucos cães com infecção aguda de *E. canis* apresentam mórulas em esfregaços sanguíneos (WOODY; HOSKINS, 1991). Em Monte Negro (Rondônia), a prevalência foi de 24,8% de cães infectados (AGUIAR et al., 2007). Sainz et al. (1996) e Dagnone et al. (2002) observaram que cães que habitavam área urbana periférica ou rural tinham maiores riscos de infecção por *E. canis*. De acordo com Carlos et al. (2007) e Rodriguez-vivas et al. (2005), o ambiente rural apresenta maior risco de infecção, pois a situação socioeconômica dificulta o controle do vetor e os cães são facilmente infestados por carrapatos.

A erliquiose tem sido motivo de grande interesse tanto para pesquisas em medicina veterinária quanto para saúde pública, em decorrência das recentes descobertas de infecção em humanos (STICH et al., 2008). A infecção no homem é conhecida como febre da carraça, e ocorre se o mesmo for picado por um carrapato portador, e não pelo simples contato com o cão infectado (INOKUMA et al., 2005).

A erliquiose humana apresenta-se como uma febre aguda causada pela infecção de organismos intimamente relacionados com o gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Até o momento, pelo menos cinco agentes da família Anaplasmataceae foram descritos infectando humanos, incluindo a *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia sennetsu* (BAKKEN; DUMLER, 2006).

Sabe-se que o agente causador da EGH também pode infectar naturalmente várias espécies animais. Da mesma forma, a erliquiose monocítica canina pode ser patogênica para seres humanos. Casos fatais ocorrem em aproximadamente 5% dos pacientes humanos com erliquiose monocítica (*E. chaffeensis*) e em 10% daqueles com a erliquiose granulocítica (DUMLER et al., 1995). A observação de que o carrapato *R. sanguineus* pode parasitar humanos alerta para a possível transmissão de *A. platys* e *E. canis* para esta espécie. (DANTAS-TORRES et al., 2006; RAMOS et al., 2009).

O diagnóstico da doença é realizado pela observação de mórulas em leucócitos na citologia, por isolamento em cultivo celular, pesquisa de anticorpos e por técnicas moleculares.

O diagnóstico citológico apresenta sucesso em apenas 4% dos casos, sendo mais sensível na fase aguda da infecção (WOODY; HOSKINS, 1991). As erlíquias são encontradas em granulócitos ou em plaquetas dos esfregaços sanguíneos de animais nos estágios iniciais da doença. As que têm como alvo os monócitos estão presentes com menor frequência nesses esfregaços (BREITSCHWERDTET al., 1998).

Resultado falso positivo pode ser dado ao confundir a mórula com plaquetas, grânulos linfocíticos azurofílicos e material nuclear fagocitado. Além disso, outros organismos erliquiais pertencentes à família Anaplasmatacea (*E. chaffeensis*, *N. risticii* e *E. ruminantium*) também podem infectar monócitos caninos (BREITSCHWERDTET al., 1998).

A infecção por *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, que podem ser observados na circulação sanguínea 7 dias (IgM) a 15 dias (IgG) após a infecção (WANER et al., 2001). Inicialmente os títulos de IgG são relativamente baixos, mas à medida que a infecção progride, o aumento do título é evidente. Os cães que se recuperam da fase aguda ou aqueles que recebem inadequado tratamento progridem para a fase da infecção inaparente (HARRUS et al., 1997). Portanto, altos títulos de anticorpos em cães aparentemente normais pode indicar persistência da infecção e estímulo antigênico crônico (WANER et al., 2001).

Vários métodos sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da EMC e são considerados ferramentas valiosas. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos IgG anti - *E. canis* é considerado o teste sorológico “padrão ouro”, indicando exposição a *E. canis*. A IgM não é considerada um indicador real de exposição devido ao desenvolvimento inconsistente dessa imunoglobulina no curso da doença (MCBRIDE et al., 2003).

A principal desvantagem dos métodos sorológicos é a dificuldade em distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia. Além disso, na técnica podem ocorrer reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DAGNONE et al., 2001; WANER et al., 2001; CARDENAS et al., 2007). 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 carrapatos e, também, títulos de anticorpos persistentes após o tratamento.

Existe ainda uma considerável variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos (SHAW et al., 2001). Títulos de IgG 1:40 são considerados positivos para a exposição a *E. canis*. Em infecções agudas, são recomendados dois testes consecutivos, com intervalo de 7-14 dias, um aumento de 4 vezes nos títulos de anticorpos é sugestivo de uma infecção ativa. Anticorpos IgG anti - *Ehrlichia* persistem por vários meses após o tratamento e eliminação da bactéria (HARRUS; WANER, 2011).

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.

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia*, pela identificação de sequências específicas no DNA da bactéria. Na fase aguda, a *Ehrlichia* pode ser facilmente detectada no sangue, enquanto que na fase subclínica e crônica, os tecidos mais apropriados para confirmar o diagnóstico são o baço e a medula óssea, respectivamente (HARRUS et al., 1998; HARRUS et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2004). Em trabalho realizado por Rotondano et al., (2012) ficou evidenciado que a utilização de sangue total para detecção de DNA erliquial é melhor que a utilização de frações sanguíneas.

A técnica pode ser realizada com vários genes alvo (16S rRNA, p28, p30, dsb, VirB9), entretanto o teste de PCR para o gene 16S rRNA e o p30 são os mais comumente usados. O fato de que *E. canis* contém múltiplas cópias do gene p30, mas somente uma cópia do gene 16S rRNA, aumenta as chances para a detecção do patógeno quando o alvo é o primeiro (STICH et al., 2008).

Outras técnicas derivadas da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo, a nested PCR (nPCR), RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) e PCR em tempo real (MURPHY et al., 1998; WEN et al., 1997; LABRUNA et al., 2007).

Uma análise comparativa entre a PCR para o gene dsb e a nested-PCR para o 16S rRNA realizada com amostras de sangue de cães naturalmente infectados por *E. canis*, demonstrou que as duas técnicas são adequadas ao diagnóstico da EMC (MACHADO, 2004). As vantagens adicionais da PCR em etapa única são a redução de falsos-positivos devido à contaminação por amplicons da primeira etapa e a diminuição no tempo de execução da técnica, sendo também muito utilizada no diagnóstico da EMC (ALVES et al., 2005).

A PCR em tempo real vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos, sendo também denominada PCR quantitativa (qPCR). Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR convencional (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A qPCR é mais sensível do que a PCR convencional além de permitir a quantificação da carga bacteriana. Esta técnica de diagnóstico tem sido utilizada para quantificar a carga de *Ehrlichia* em cães infectados naturalmente e experimentalmente (BANETH et al., 2009). A probabilidade de contaminação na PCR em tempo real é menor do que na PCR convencional. Dessa forma, a qPCR vem se tornando rapidamente o método preferencial para o diagnóstico de *E. canis* (HARRUS; WANER, 2011).

O objetivo desse trabalho foi determinar, por ferramentas sorológica e molecular, a prevalência da Erliquiose Monocítica Canina causada por *E. canis* no município de Patos, Paraíba, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de Execução

O presente trabalho foi desenvolvido no município de Patos/PB. Os testes de diagnóstico foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária no Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos – PB, na BIOGENE Ind & Com. Ltda, sediada na incubadora de empresas da Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

### Caracterização da Área

O município de Patos está situado a uma altitude média de 242 m acima do nível do mar, distando em aproximadamente 300 km de João Pessoa, a capital do Estado. Apresenta clima semiárido, com área de 513 Km<sup>2</sup> e população de 100.674 habitantes. A temperatura média é de 32°C, umidade relativa média do ar de 55% e precipitação pluviométrica média anual de 700 mm e (IBGE, 2010).

### Amostragem

Para o cálculo do número amostral foram considerados os parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (NOORDHUIZEN et al., 1997; THRUSFIELD, 1995):

$$n = Z^2 \times P(1 - P)/d^2$$

Onde:

n = número de animais a serem utilizados

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%    Z = 1,96

P = prevalência esperada    P = 50%

d = erro absoluto    d = 10%

Foi utilizado o programa SPSS 13.0 for Windows para o cálculo da especificidade, sensibilidade e valor Kappa.

### Obtenção das Amostras

Fizeram parte do experimento 100 cães de diferentes faixas etárias, machos e fêmeas, com ou sem carrapatos, provenientes de diferentes bairros da cidade, coletados aleatoriamente. A colheita do material biológico foi realizada por venopunção cefálica, em um total de 5 ml de sangue, com o auxílio de seringa de 5 ml BD e agulhas 25 X 8 mm BD. O sangue coletado foi depositado imediatamente em tubo de ensaio plástico contendo o anticoagulante citrato de sódio (4%).

Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, da UFCG, campus de Patos – PB. A amostra foi mantida sob refrigeração *overnight* visando a separação de alíquota do plasma para a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e do sangue total para extração de DNA e realização de PCR e qPCR. As amostras foram identificadas individualmente e congeladas a -20°C, até a realização dos exames.

### Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A sorologia foi efetuada por meio da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), de acordo com Ristic et al. (1972).

Monocamadas de células DH82, inoculadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, apresentando 80-90% de infecção, foram desprendidas da garrafa com auxílio de raspadores apropriados. A suspensão de células foi centrifugada a 4000g por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas na concentração de 10.000 células por mililitro em solução tampão fosfato

(PBS pH 7,2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, NaCl 0,147M). Foram adicionados 10µl da solução em cada orifício das lâminas para imunofluorescência, sendo as mesmas secadas em temperatura ambiente por duas horas, com posterior fixação em acetona por 10 minutos e estocagem a -20°C até o momento do uso.

O ponto de corte estipulado para a RIFI foi a diluição de 1:40, conforme adotado por McBride et al. (2001). Os soros foram aplicados às lâminas com antígeno previamente fixado, sendo incubados por 30 minutos a 37° C em câmara úmida. Em seguida, foram feitas 2 (duas) lavagens de 10 minutos em PBS 7,2. Após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado conjugado de coelho anti-IgG de cão (Sigma-Aldrich®) na diluição de 1:32. Novamente as lâminas foram incubadas a 37° C por 30 minutos e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem, aplicou-se glicerina tamponada pH 8,5 em cada lâmina, com posterior visualização em microscópio de epifluorescência BX41 (OLIMPUS®).

Os soros controles positivo e negativo foram cedidos pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

### **Extração de DNA**

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada por meio de reagente comercial, a base de fenol e tiocianato de guanidina (Brazol® – LGC Biotecnologia). Foi adicionado 1ml do reagente para cada 300 µL de amostra. Os tubos foram agitados com auxílio de agitador tipo vortex e 250 µL de clorofórmio gelado foram adicionados. As amostras foram centrifugadas em 12.000g (aproximadamente 10.000 rpm) à 4°C, por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 500 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão. As amostras foram centrifugadas por 20 min. O pellet foi lavado 2X com 1 ml de etanol 70%. O pellet foi secado a temperatura ambiente. Para a realização da dosagem de DNA, o pellet foi dissolvido em água ultrapura ou tampão TE 1X estéril (50 ul) e quantificado através de leitura em espectrofotômetro UV/visível de mono haz 230 - 650 nm – Biophotometer plus (Eppendorf®).

### **Reação em Cadeia pela Polimerase convencional (PCRc)**

As amostras de DNA foram testadas por PCR convencional para a presença de *E. canis* com primers que amplificam região do gene 16S rRNA, conforme protocolo descrito por Sambrook (2003). As sequências dos primers utilizados são EC 01 (5'-GTGGCAGACGGGTGAGTAAT-3') e EC 02 (5'-CGTTGTTCCGGAATTATTGGG-3').

A primeira etapa a reação foi composta por 1,0µl do DNA da amostra em 5,0 µl de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl), 0,2mM de cada desoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,5 µM de cada primer, previamente sintetizado, 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Bio Labs®) e água ultra-pura q.s.p 20 µl. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador. A amplificação consistiu em um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, 56,4° C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após a termociclagem, 5µL de cada reação foi adicionada a 1 µL de Blue green Loading dye I (LGC®) e em sequência aplicados em gel de agarose a 1,2 % e submetidos à eletroforese em cuba horizontal com tampão TBE 0,5 X (Tris base 1M, ácido bórico anidro 1M e EDTA sódico di-hidratado 20 mM). As bandas amplificadas foram visualizadas em transluminador ECX 20.M (Vilber Lourmat®).

### **Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR)**

A amplificação em tempo real foi composta de duas etapas. Para a primeira reação os seguintes reagentes foram utilizados: 6 µL de SYBR Green Rox Plus (LGC®), 0,5 µL de cada primer específicos para um gene de múltiplas cópias (informação confidencial para pedido de patente) de *E. canis*, na concentração de 2 µM, 1µL de DNA de cada amostra e 5µL de água ultrapura. A termociclagem consistiu em um ciclo inicial a 95° C, durante 15 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, 62° C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 15 segundos e uma extensão final a 65 °C por 20 minutos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 100 animais testados pela RIFI, 65% possuíam anticorpos anti - *E. canis*, demonstrando a alta prevalência da doença no município (Figura 1). Resultado semelhante foi obtido por Azevedo et al., (2011) em um levantamento em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFCG, campus de Patos-PB. Melo et al. (2011) observaram positividade de 74,3% de cães em Poconé (região do Pantanal), Estado do Mato Grosso. Souza et al. (2010) observaram prevalência inferior (35,6%) em cães domiciliados do município de Salvador-BA.

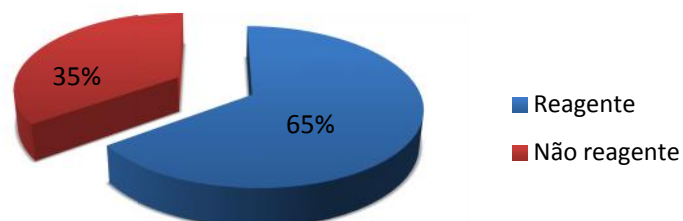


Figura 1- Prevalência de anticorpos anti - *Ehrlichia canis* em cães no município de Patos, PB – 2011.

Os títulos de anticorpos variaram de 160 a 10.240 (Tabela 1). A maioria dos animais infectados por *E. canis* apresentavam baixo título de anticorpos (1: 160), descartando a possibilidade de cronicidade da doença. Os 13 animais que apresentavam títulos maiores ou iguais a 2.560 são altamente sugestivos de infecção atual ou persistente, se o animal não tiver sido tratado.

Altos títulos de anticorpos podem estar relacionados à cronicidade da infecção e a resposta exagerada ao antígeno (Waner et al., 2001) devido estímulo antigênico prolongado, resultando na produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos (PERRILE; MATUS, 1991).

A persistência de altos títulos de anticorpos positivos para *E. canis* pode indicar infecção não debelada, reinfecção ou simplesmente pode ser indicativa de infecção passada (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; WANER et al., 2001). Testes sorológicos pareados podem indicar a sor conversão ou a ascensão dos títulos (HARRUS et al., 2002; NEER et al., 2002).

Tabela 1. Valor absoluto e porcentagem de cães reagentes para *Ehrlichia sp* pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Títulos	Cães	
	Reagentes	%
160	41	63,1
320	-	-
640	1	1,5
1.280	10	15,4
2.560	3	4,6
5.120	2	3,1
10.240	8	12,3
Total	65	100

No Brasil, diferentes taxas de prevalências são observadas nos Estados do Nordeste e do Sul, associando-se a uma melhor adaptação do carrapato ao clima quente e úmido do que temperado (SILVA et al., 2010). De acordo com Keefe et al. (1982) cães situados em zonas tropicais e subtropicais apresentam maiores frequências de infecção por *E. canis*. Em Belo Horizonte/MG, Moreira et al. (2003) encontraram 59,6% de positividade e em Jaboticabal/SP, Nakaghi et al. (2008) obtiveram uma taxa de 63,3%. Resultados inferiores foram relatados no Paraná (23%) (TRAPP et al., 2006), em Rondônia (31,2%) (Aguiar, 2006), na Bahia (36% e 35,6%) (CARLOS et al., 2007; SOUZA

et al., 2010) , em Cuiabá (42.5%) (SILVA et al., 2010), e em Campos dos Goytacazes (13,9%) (ALBERNAZ et al., 2007). A variação na prevalência da infecção também pode estar relacionada às diferenças na população de cães estudadas, nas diferenças geográficas, exposição ao vetor e no método de diagnóstico utilizado (SOLANO-GALLEGO et al., 2006).

A sorologia é uma ferramenta bastante utilizada para investigação epidemiológica de diversas enfermidades, mas sua inabilidade para distinguir entre infecção atual e exposição prévia é amplamente reconhecida como uma desvantagem deste teste (MURPHY et al., 1998). A RIFI indica apenas que houve ou há a infecção no animal, não sendo capaz de identificar a espécie envolvida, decorrente da presença de reações cruzadas entre as espécies de *Ehrlichia spp.* (WANER et al., 2001).

A PCR e o sequenciamento podem ser úteis para confirmar cães suspeitos de infecção por *E. canis* que não exibiram título de anticorpos notavelmente elevados (BABA et al., 2011).

Pela técnica de PCR houve amplificação do gene 16S rRNA de *E. canis* em 84% dos cães (Figura 2). Trabalhos realizados com a mesma técnica mostraram taxa de positividade que variaram de 22 a 63.1% (MYLONAKIS et al., 2010; RODRIGUES-VIVAZ, 2005; UENO et al., 2009; BULLA et al., 2004; MACIEIRA, 2005; SANTOS et al., 2009; ALEXANDRE et al., 2009). Estas variações podem ser atribuídas aos protocolos utilizados e aos fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da erliquiose nas regiões estudadas (SOUZA et al., 2010).

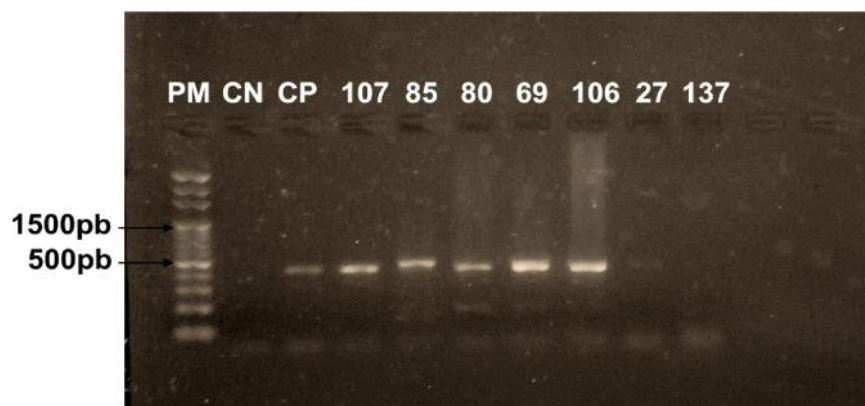


Figura 2: Produtos da reação em cadeia pela polimerase (PCR) com primers específicos para *Ehrlichia canis*. PM: Peso Molecular; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; Setas pretas: amostras positivas; Amostras 27 e 137: amostras negativas.

A PCR tem também vantagens como a alta sensibilidade, rapidez e segurança, permitindo a identificação específica do agente infeccioso. Entretanto, dificuldades podem existir em distinguir aqueles animais soropositivos para *E. canis* portadores crônicos, dos soropositivos mas não infectados (MCBRIDE et al., 1996).

A técnica de qPCR amplificou DNA de *E. canis* em 95% das amostras analisadas. NDIP (2005), utilizando a mesma técnica, obteve 16% (17/104) de amostras amplificadas, sendo 15% delas DNA de *E. canis*. A qPCR poderá ser negativa em casos de infecções passadas ou quando os níveis de DNA erliquial estiverem abaixo dos limites detectáveis por esta técnica.

31% e 34% dos animais foram negativos na RIFI e positivos na PCR e qPCR, respectivamente. Outros estudos também têm relatado PCR positiva para cães nos quais não foram detectados anticorpos no soro (MURPHY et al., 1998; LIDDELL et al., 2003). Esses resultados podem indicar, possivelmente, uma infecção na fase aguda, na qual ainda não houve soro conversão e, portanto, esses cães tendem a apresentar resultados negativos à RIFI (WANER et al., 1996; WANER et al., 2001; NEER et al., 2002). Também os casos hiperagudos podem ser positivos na PCR sem resposta de anticorpos, para os quais testes moleculares detectam a presença do agente antes mesmo da resposta imunológica do cão ocorrer (CARLOS et al., 2011).

Apenas 1 (uma) amostra foi positiva na RIFI e negativa nas técnicas PCR e qPCR, sugerindo a ocorrência de reação cruzada ou de uma fase crônica da infecção visto que esse animal apresentou



titulação 1: 1.280. (Tabela 2). Animais sorologicamente positivos podem estar relacionados a reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DAGNONE et al., 2001; WANER et al., 2001; CARDENAS et al., 2007). Alguns dos cães estudados possivelmente tiveram EMC clínica, recuperaram-se da doença e apresentaram anticorpos para *E. canis* durante o teste, enquanto outros foram prováveis portadores de doença subclínica (WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998).

Na fase aguda, a *Ehrlichia* pode ser facilmente detectada, pó PCR, no sangue, enquanto que na fase subclínica e crônica, os tecidos mais apropriados para confirmar o diagnóstico são o baço e a medula óssea, respectivamente (HARRUS et al., 1998; HARRUS et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2004). Em trabalho realizado por Rotondano et al., (2012) ficou evidenciado que a utilização de sangue total para detecção de DNA erliquial é melhor que a utilização de frações sanguíneas.

Das 100 amostras avaliadas, apenas 1(uma) delas foi negativa nos três testes, sendo este, provavelmente, o único animal ainda não exposto à bactéria.

Tabela 2: Associação das técnicas de RIFI, PCR e da qPCR a partir das 100 amostras de sangue canino provenientes do município de Patos/PB.

TÉCNICAS		PCR convencional		PCR em tempo real	
		Neg	Pos	Neg	Pos
RIFI	Neg	4	31	1	34
	Pos	12	53	4	61
	<b>Total</b>	16	84	5	95

Neg: negativo; Pos: positivo

Alguns autores têm sugerido a utilização da combinação RIFI e PCR no diagnóstico da erliquiose canina, indicando que estes testes são mais sensíveis e mais hábeis para detectar a infecção em diferentes estágios (IQBAL et al. 1994; WEN et al., 1997).

Entre os 84% dos animais positivos na PCR convencional para *E. spp.*, 96,4% (81/84) foram também positivos na PCR em tempo real para *E. canis*.(Tabela 3). Associando-se as duas técnicas foi possível verificar que 99% das amostras são positivas. Este valor está acima da prevalência de 43% já relatada na região Nordeste (CARLOS, 2007).

Um total de 3,57% (3/84) dos animais positivos na PCR convencional (gênero-específica) foi negativo na PCR em tempo real para *E. canis*. Uma das justificativas para este resultado é a possível infecção por outra espécie do gênero *Ehrlichia*. Oliveira et al. (2009) identificaram DNA de *E.ewingii* em cães atendidos na rotina médica, e sugeriram que essa espécie possa também estar envolvida na ocorrência de infecções erliquiais em nosso país, uma vez que já relatos da presença de tal agente no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (MURPHY et al., 1998) principal vetor de *E. canis* e bastante comum no Brasil.

Tabela 3: Resultados obtidos a partir da amplificação do gene 16S rRNA por PCR convencional e PCR em tempo real.

TÉCNICAS		PCR em tempo real		Total
		Neg	Pos	
PCR convencional	Neg	2	14	16
	Pos	3	81	84
<b>Total</b>		5	95	100

Neg: negativo; Pos: positivo

Quando as técnicas PCRc e qPCR foram comparadas para avaliar sensibilidade e especificidade, o índice Kappa apresentou grau de concordância fraco (TABELA 4). Dos 95 animais positivos na PCR em tempo real, 14,73% (14/95) foram negativos na PCR convencional, sugerindo que as amostras continham baixa concentração de DNA erliquial, sendo a PCR em tempo real mais sensível que a técnica convencional e capaz de detectar baixas quantidades de DNA. Labruna et al. (2007), utilizando qPCR verificaram em 60% (3/5) dos cães amplificação de DNA erliquial, a técnica foi capaz de identificar o mínimo de 10 cópias do gene dsb de *E. canis*. A sensibilidade mais baixa da PCRc pode ser justificada por dois fatores: a) o gene alvo utilizado 16S rRNA possui cópia única e o gene utilizado para a PCR em tempo real tem múltiplas cópias; b) características intrínsecas da qPCR, como o uso de fluorocromos, aumentam a sensibilidade da técnica.

Tabela 4: Associação estatística entre as técnicas RIFI, PCR e real time PCR.

TÉCNICAS	EXATO DE FISCHER	VALOR KAPPA
RIFI x PCRc	0,4	-0,08
RIFI x qPCR	1	0,01
PCRc x qPCR	0,5	0,03

RIFI: reação de imunofluorescência indireta; PCRc: PCR convencional; qPCR: quantitative PCR

Através da associação entre a RIFI, PCR e a qPCR foi possível identificar uma alta porcentagem de animais infectados com *E. canis*, onde vários ainda eram soronegativos. 51% (51/100) das amostras foram positivas para os três testes, indicando uma alta taxa de infecção na área estudada.

## CONCLUSÕES

Pela elevada prevalência de *E. canis* em cães domiciliados na cidade de Patos, Estado da Paraíba os resultados indicam um risco iminente de exposição da população canina e humana a esse agente erliquial, e um problema em potencial na manutenção da saúde pública do município em questão. Além disso, as técnicas moleculares mostraram-se mais eficientes na detecção da doença quando comparadas à sorologia.

## AGRADECIMENTOS

À UFCG pela concessão da bolsa PIVIC;

Ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Mato Grosso pela colaboração no trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M. Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil – São Paulo: D. M. de Aguiar, 2006. 95f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

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, 2007.

ALBERNAZ, A. P.; MIRANDA, F. J. B.; MELO JR., O. A.; MACHADO, J. A.; FAJARDO, H. V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALEXANDRE, N.; SANTOS, A. S.; NÚNCIO, M. S.; SOUSA, R.; BOINAS, F.; BACELLAR, F. Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. **Veterinary Journal**, v. 181, p. 343-344, 2009.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 135 p. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935): avaliação parasitológica, hematológica, bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 1998. 115p.

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**. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F., Erliquiose canina - revisão. **Clínica Veterinária**, v.4, n. 18, p. 31-38, 1999.

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

AZEVEDO, S. S.; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F.; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. F.; UCHÔA, I. C. P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.

BABA, K.; ITAMOTO, K.; AMIMOTO, A.; KITAGAWA, K.; HIRAOKA, H.; MIZUNO, T.; SATO, H.; OKUDA, M. *Ehrlichia canis* infection in two dogs that emigrated from endemic areas. **The Journal of veterinary medical science**, v. 74, p. 775-778, 2011.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Clinical Diagnosis and Treatment of Human Granulocytotropic Anaplasmosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 236-247, out, 2006.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 321-325, 2009.

BIRCHARD, J. S.; SHERDING, G. R. Clínica de pequenos animais. **Manual Saunders**. 2 ed, São Paulo: Roca, 2003.

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*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2645-2651, 1998.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO JR., J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WEIDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO JR., J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WEIDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.

CARDENAS, A.M., DOYLE, C.K., ZHANG, X., NETHERY, K., CORSTVET, R.E., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins

gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p. 123–128, 2007.

CARLOS, R. S. A.; NETA, E. S. M.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L. S.; BRITO, R. L. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. P. Frequencia de Anticorpos anti- *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e Antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microregião Ilhéus – Itabuna, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CARLOS, R. S.; CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; ALMOSNY, N.R.; ALBUQUERQUE, G.R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 20, p. 210-214, 2011.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Ehrlichiosis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ehrlichiosis/index.html>. Acesso em: 29/05/2012.

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

DAGNONE, A. S. Soroepidemiologia e avaliação citológica e molecular da infecção por Ehrlichia sp. em cães de uma população hospitalar. Londrina, 2002. 114p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, 2002.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**. n. 2. p. 191- 201, 2001.

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

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

DUMLER, J. S.; CHEN, S. M.; ASANOVICH, K.; TRIGIANI, E.; POPOV, V. L.; WALKER, D. H. Isolation and characterization of a new strain of Ehrlichia chaffeensis from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1704-1711, 1995.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and *ehrlichia* exposure in brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470-477, 2006.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T.; Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 361-368, 2002.

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

INOKUMA, H.; OYAMADA, M., KELLY, P. J.; JACOBSON, L.A., FOURNIER, P., ITAMOTO, K., OKUDA, M., BROUQUI, P. Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from south Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2934-2937, jun. 2005.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1658-63, 1994.

KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; ISOGAI, E.; TAKAHASHI, M.; MISUMI, H.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; ZHANG, C.; TSUJI, M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1837-1843, 2004.

KEEFE, T. J.; HOLLAND, C. J.; SALYER, P. E.; RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 3, p. 236-238, 1982.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. AM; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P. WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

LIDDELL, A.M.; STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A.; SUMNER, J.W.; PADDOCK, C.D.; GAUDREAU-KEENER, M.; ARENS, M.Q.; STORCH, G.A. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4617-4622, 2003.

MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 53-57, 2004.

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.1, p. 44-8, 2005.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E., GAUNT, S. D., BOUDREAUX, C., GUEDRY, T., WALKER, D.H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2516-2524, 2003.

MCBRIDE, J.W. CORSTVET, R.E.; BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.315-322, 2001.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 441-447, 1996.

MELO, A.L.; MARTINS, T.F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 2, p. 213-218, 2011.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAUJO, R. B. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, abr. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KRITSEPI-KONSTANTINOY, M.; DUMLER, J. S.; DINIZ, P. P.; DAY, M. J.; SIARKOU, V. I.; BREITSCHWERDT, E. B.; PSYCHAS, V.; PETANIDES, T.; KOUTINAS, A. F. Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 633-638, 2010.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A. F., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., BILLINIS, C. D., LEONTIDES, L. S., KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 174-184, 2004.

NAKAGHI A. C. H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, **Ciência Rural**, v. 38, p. 766-770, 2008.

NDIP, L.M.; NDIP, R. N.; ESEMU, S. N.; DICKMU, V.L.; FOKAM, E.B.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J. W. Ehrlichial infection in cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 59-66, 2005.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine, Lawrence**, v. 16, p. 309-315, may-jun, 2002.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p.10-13, n.33, 2004.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, A.; STEPHENSON, E. Cell-mediated and humoral immune 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, L. S; MOURÃO, L. C.; OLIVEIRA, K. A.; AGOSTIN, N. M.; DE OLIVEIRA, A. C.; DE ALMEIDA, A. C. M. R.; FIETTO, J. L. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; FILHO, J. D. R.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, suppl. 2, p. 53-54, 2009.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES JR, D.S.; SOUZA I.I.F.; ONO, T.M. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.58-62, 2009.

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

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.; WEISIGER, R.M.; HILDEBRANDT, P.K.; NYINDO, M.B.A. Serological Diagnosis of Tropical Canine Pancytopenia by Indirect Immunofluorescence. **Infection and Immunity**, v. 6, p. 226-231, 1972.

RODRIGUES, D.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A. F. S. F.; FELICIANO, E. A.; SOARES, A. O.; SOUZA, A. D. Levantamento de hemoparasitos em cães da área rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suppl. 1, p. 371, 2004.

RODRIGUES-VIVAZ, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 4, p. 81-85, 2005.

ROTONDANO, T. E. F.; ALMEIDA, A. M. P.; LUSTOSA, E. M. C.; CORDEIRO, A. A.; CAMBOIM, E. K. A.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. An Assessment of Whole Blood and Fractions

by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **The ScientificWorld Journal**, Volume 2012, Article ID 605743, 6p.

SAINZ, A. 1996. Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Universidad Complutense de Madrid. **Tese de Doutorado**. Madrid, 255p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.

SAINZ, A.; KIM, C. H.; TESOURO, M. A.; HANSEN, R.; AMUSATEGUI, I.; KOO, H. Y.; KAKOMA, I. Serological evidence of exposure to Ehrlichia species in dogs in Spain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 635-642, 2000.

SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.; ZUCOLOTO, L.B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, p. 145-148, 2009.

SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Tickborne Infectious diseases of dogs. **Trends Parasitology**, v.17, p.74-80, 2001.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; HEGARTY, B.; ESPADA, Y.; LLULL, J.; BREITSCHWERDT, E. B. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 274- 277, 2006.

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

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

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. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

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

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

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. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T.; ROSNER, M.; HARRUS, S.; NAVEH, A.; ZASS, R.; KEYSARY, A. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 63, p. 331-335, 1996.

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

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1852-1855, 1997.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of the dog. **Veterinary Clinical North America: Small animal practice**, v. 21, p. 45-98, 1991.