Jonas Moraes-Filho

**Competência vetorial de carrapatos do grupo
Rhipicephalus sanguineus do Brasil, Argentina e
Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*,
agente etiológico da erliquiose monocítica canina**

São Paulo

2013

Jonas Moraes Filho

**Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus*
do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia*
canis, agente etiológico da erliquiose monocítica canina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2856
FMVZ

Moraes-Filho Jonas

Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina. / Jonas Moraes Filho. -- 2013.
59 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Cães. 2. Carrapatos. 3. *Rhipicephalus sanguineus*. 4. Competência vetorial. 5. *Ehrlichia canis*.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Competência vetorial de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Uruguai e Argentina para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina", protocolado sob o nº2100/2010, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/9/2010.

São Paulo, 3 de julho de 2013

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORAES-FILHO, Jonas.

Título: Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha esposa Andressa, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, sempre paciente, amorosa, compreensiva e dedicada.

Aos animais que participaram deste projeto de estudo, que de algum modo privaram sua vida e liberdade.

Ao meu avô Sebastião Moraes (*in memoriam*) por sempre ter sido meu incentivador.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente DEUS.

A minha esposa ANDRESSA pela paciência, colaboração, compreensão, amor e momentos únicos.

Ao meu orientador Marcelo Bahia Labruna, por novamente ter confiado nesse novo desafio.

Aos meus pais, sogros, avós, irmãs, cunhados, cunhada, sobrinhas e sobrinhos.

Aos amigos e familiares.

Aos professores e funcionários do VPS/FMVZ /USP Campus Pirassununga - SP, onde tal ajuda foi essencial para realização deste projeto.

A Equipe do HOVET Pirassununga- SP pelo suporte na realização dos exames.

Aos amigos do Laboratório de Parasitárias do VPS/FMVZ/USP Campus São Paulo, principalmente da “repartição” Carrapatos, por todos esses anos de convívio e amizade.

Aos professores e funcionários do VPS/FMVZ/USP do Campus São Paulo, sempre a disposição naquilo que foi necessário para realização deste estudo.

Aos animais que participaram deste estudo, em especial, aos 16 cães que participaram deste projeto de pesquisa, que me proporcionaram momento de crescimento pessoal, me mostrando o quanto são capazes de serem sinceros, companheiros e amigos.

Aos pesquisadores que me enviaram *Rhipicephalus sanguineus* de diversas partes do país e América do Sul, para que tais dados pudessem ser alcançados.

A Professora Dra. Rosângela Machado Zacarias por ceder o inóculo de *Ehrlichia canis*, cepa Jaboticabal., algo fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

A velha guarda do Laboratório Carrapatos do VPS/FMVZ/UPS: Adriano Pinter, Mauricio Horta e Richard Campos Pacheco.

Ao CORINTHIANS, por proporcionar momentos felizes e descontraídos com títulos importantes como: Brasileiro, Libertadores, Mundial e Recopa.

A FAPESP e CAPES/CNPQ pelo suporte financeiro.

RESUMO

MORAES-FILHO, J. Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina. [Vector competence of the group *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil, Argentina and Uruguay for transmission of the bacterium *Ehrlichia canis*, causative agent of canine monocytic ehrlichiosis]. 2013. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Estudos filogenéticos recentes mostram que na América Latina há dois grupos distintos de carrapatos identificados como *R. sanguineus*. Carrapatos *R. sanguineus* da chamada América Latina temperada (Chile, Argentina, Uruguai e estado do Rio Grande do Sul) formam um grupo monofilético, claramente distinto de um segundo grupo monofilético, formado por *R. sanguineus* da denominada América Latina tropical (desde México ao estado Brasileiro de Santa Catarina), com claras possibilidades desses dois grupos estarem representados por duas espécies distintas dentro do complexo *sanguineus*. Estudos sobre erliquiose canina (causada por *Ehrlichia canis*) na América Latina indicam que *E. canis* é altamente prevalente em países da América Latina tropical, porém rara ou escassa na América Latina temperada. Desta forma, a hipótese primária do presente projeto foi que a ausência ou escassez de casos de erliquiose canina na América Latina temperada se deve à baixa competência vetorial dos carrapatos sob o táxon *R. sanguineus* presentes nessa região, ao contrário da América tropical, em que os carrapatos presentes sob o táxon *R. sanguineus* possuem alta competência vetorial para *E. canis*. Baseado no exposto acima, o objetivo geral do presente projeto foi avaliar de forma comparativa a competência vetorial de quatro populações de *R. sanguineus* da região Neotropical, uma representando a América Latina tropical e três representando a América Latina temperada. Carrapatos nas fases de larvas e ninfas, derivados de quatro populações de *R. sanguineus*, provenientes da Argentina (América Latina temperada), Estado do Rio Grande do Sul (América Latina temperada), Uruguai (América Latina temperada) e da cidade de São Paulo, Brasil (América Latina tropical) foram expostos a *E. canis*, ao se alimentarem em cães infectados com *E. canis*, na fase aguda da doença. Em paralelo, larvas e ninfas não infectadas de cada uma das quatro populações foram levadas a infestar cães não infectados (grupo controle). As larvas e ninfas ingurgitadas, recuperadas nessa primeira fase, foram deixadas em estufa para realizarem ecdise para ninfas e adultos, respectivamente. Parte destas ninfas e adultos foi separada para análises moleculares. Outra parte dessas ninfas e adultos foi levada a infestar cães susceptíveis, a fim de se verificar a competência vetorial desses carrapatos das quatro populações. Nas infestações realizadas, amostras de sangue dos cães infestados foram colhidas semanalmente durante sessenta dias. Parte desse sangue foi processado imediatamente para hemograma, mostrando que somente os cães infestados com adultos de *R. sanguineus* de São Paulo, expostos a *E. canis* na fase de ninfa, apresentaram alterações marcantes de números de eritrócitos, volume globular, hemoglobina e plaquetas abaixo do valor mínimo de referência para cães saudáveis. Todos os demais cães infestados apresentaram valores de hemograma sem grandes alterações significativas. Nenhum cão apresentou febre. A outra parte do sangue colhido semanalmente foi separada para processamento por PCR em tempo real para pesquisa de DNA de *E. canis* e sorologia para pesquisa de anticorpos anti-*E. canis*. As análises moleculares (PCR em tempo real para pesquisa de DNA de *E. canis*) e sorológicas (imunofluorescência indireta) de todos esses cães foram realizadas,

assim como as análises moleculares dos carrapatos, a fim de se verificar a frequência de carrapatos de cada população que se infectou, após se alimentarem em cães infectados. Os resultados indicam que somente os carrapatos da colônia de São Paulo (América Latina tropical) foram competentes para transmitir a doença a três cães saudáveis, que se mostraram positivos na PCR em tempo real e na soroconversão para *E. canis*. Todos os cães infectados com carrapatos das colônias da América Latina temperada (Chile, Argentina, Uruguai e estado do Rio Grande do Sul) não se infectaram por *E. canis*, mesmo que esses carrapatos haviam se alimentado, num estágio anterior, em um cão sabidamente infectado. Os testes moleculares dos carrapatos corroboram esses resultados, uma vez que nenhum carrapato adulto (exposto *E. canis* na fase de ninfa) das colônias da Argentina e Uruguai se mostrou positivo na PCR em tempo real, ao passo que pelo menos 1% das ninfas e 28% dos adultos de *R. sanguineus* da colônia São Paulo se mostraram positivos, após se alimentarem como larvas e ninfas, respectivamente, no mesmo cão infectado que serviu de alimento para os carrapatos da América Latina temperada (Uruguai, Argentina e Rio Grande do Sul). Em relação aos carrapatos provenientes do estado do Rio Grande do Sul, 4% dos adultos analisados logo após a ecdise se apresentaram positivos na PCR em tempo real, mas nenhum adulto foi positivo 30 dias após a ecdise. Como os carrapatos dessa população não foram competentes para transmitir a bactéria para cães susceptíveis, presume-se que os resultados positivos na PCR logo após a ecdise se deva a DNA residual da bactéria ingerida na alimentação da ninfa no cão infectado. Carrapatos adultos das quatro populações estudadas foram inoculados pela via intracelomática com emulsão de células DH82 infectadas com *E. canis*. Após ficarem incubados por 10 dias numa incubadora BOD a 25°C, se alimentaram por cinco dias em coelhos, quando então foram manualmente retirados e tiveram suas glândulas salivares dissecadas e submetidas a extração de DNA. Pela PCR em tempo real, somente 1 (10%) de 10 carrapatos da população de São Paulo foi positivo para *E. canis*, ao passo que nenhum carrapato das demais populações (10 carrapatos por população) foi positivo. Amostras de carrapatos adultos do grupo *R. sanguineus* coletados a campo em diferentes regiões do Brasil foram analisadas através da técnica de PCR em tempo real para verificar a presença da bactéria *E. canis*. Foram coletados *R. sanguineus* dos seguintes locais (30 a 374 carrapatos por localidade): São Paulo/SP, Cuiabá/MT, Campo Grande/MS, Paulo Afonso/BA, Cachoeira do Sul/RS, São Luís/MA, Uberlândia/MG, Bandeirantes/PR, Petrolina/PE, Ji-Paraná/RO; e amostras de Montevideu (Uruguai) e Rafaela (Argentina). Apenas os carrapatos de Cachoeira do Sul/RS, Campo Grande/MS, Montevideu (Uruguai) e Rafaela (Argentina) foram todos negativos na PCR. Nas demais localidades, o percentual de carrapatos positivos para *E. canis* variou de 2,0 a 7,9%. Os resultados deste trabalho servem para uma melhor compreensão da ausência de casos de infecção canina por *E. canis* na América Latina temperada (cone sul) e reforçam a hipótese de que tal fato se deve à baixa competência vetorial dos carrapatos sob o táxon *R. sanguineus* presentes nessa região, ao contrário da América tropical, onde os carrapatos presentes sob o táxon *R. sanguineus* possuem alta competência vetorial.

Palavras-chave: cães, carrapatos, *Rhipicephalus sanguineus*, competência vetorial, *Ehrlichia canis*

ABSTRACT

MORAES-FILHO, J. **Vector competence of the group *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil, Argentina and Uruguay for transmission of the bacterium *Ehrlichia canis*, causative agent of canine monocytic ehrlichiosis.** [Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina]. 2013. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Phylogenetic studies have shown that in Latin America two different groups of the tick species *Rhipicephalus sanguineus*. These two groups found apart in two different regions, the Temperate region (Chile, Argentina, Uruguay and Southern Brazil) and the Tropical region (From Southern Brazil up to Mexico). It is likely that those two groups are represented by two different species within *R. sanguineus* group. Studies on ehrlichiosis (caused by *Ehrlichia canis*) in the Latin America point that *E. canis* is highly prevalent in the Tropical region whereas is rarely report in Temperate region. The present study tests the hypothesis that the distribution of ehrlichiosis are related to the low vectorial competence of the tick within the taxon group *R. sanguineus* found in the Temperate area and the high vectorial competence of the tick within the taxon group *R. sanguineus* found in the Tropical area. The objective of this study was to evaluate comparatively the vectorial competence of four *R. sanguineus* tick population, where three were collected in Temperate Area, from Argentina, Uruguay and State of Rio Grande do Sul (Brazil) and one from Tropical Area from the State of São Paulo (Brazil). Ticks from all four populations were exposed to *E. canis* through feeding upon infected dogs in acute disease phase, a control group were set up for each population by feeding larvae and nymphs on non infected dogs. All larvae and nymphs collected in this part of the study were allowed to molt in incubator (27°C, >85%RH) to nymphs and adults, respectively. Part of the ticks were selected to underwent molecular analysis, other part were released on susceptible dogs, in order to determine the vectorial competence for each of the tick populations. From the carried out infestations, samples of blood from the infested dogs were drawn weekly during 60 days. Part of the drawn blood was processed for hemogram that yielded that dogs infested with ticks from the São Paulo population, exposed to *E. canis* during the nymphal stage, showed important alteration on the number of erythrocytes, hemoglobine, packed cell volume, and platelets underneath the threshold for health dogs. All other dogs showed no important alteration in blood parameters. No fever was detected in any of the dogs. The other part of the weekly drawn blood from each dog was processed by real time PCR targeting *E. canis* DNA and processed by serology (Indirect immunofluorescence) seeking for anti-*E. canis* antibodies. Molecular analysis (real time PCR) on ticks were carried out in order to detect the prevalence of infected ticks on each population. Results show that only the ticks from the São Paulo population (Tropical Region) were competent in transmitting *E. canis* to three susceptible dogs, since material from these three dogs yielded positive in real time PCR and serology tests. All dogs infested with ticks from the Argentina, Uruguay and State of Rio Grande do Sul (Temperate Regions) population have not being infected by *E. canis*. The molecular tests on the ticks support this find since no tick from Argentina and Uruguay population yielded positive in the real time PCR, whereas about 1% of the nymphs and 28% of the adults of ticks from São Paulo population yielded positive in the real time PCR.

The ticks from the State of Rio Grande do Sul population showed 4% of positive for real time PCR among the adult ticks tested, but when these ticks fed on susceptible dogs, they were not competent in transmitting the bacterium, what may shown that these PCR positive ticks might have residual bacterium DNA in the midgut. Analysis on the salivary gland from the adult ticks from all four tick populations that were either inoculated *in vitro* with *E. canis* or feeding upon infected dogs, showed positive for *E. canis* DNA only in the São Paulo population. Samples of ticks collected from different regions of Brazil were analyzed by real time PCR in order to detect *E. canis* bacterium DNA. There were collected *R. sanguineus* from the cities of São Paulo, Cuiabá, Campo Grande, Paulo Afonso, Cachoeira do Sul, São Luís, Uberlândia, Bandeirantes, Petrolina, Ji-Paraná; e amostras de Montevideu (Uruguay) e Rafaela (Argentina). The State of Maranhão showed 7.94% of positive ticks, that being the highest prevalence found. Samples from State of Rio Grande do Sul, Campo Grande City, alongside with cities of Rafaela (Argentina) and Montevideu (Uruguay), showed none positive tick for *E. canins* bacterium DNA. All presented data contribute for a better understanding on the absence of canine ehrlichiosis cases in the Temperate Latin America (Southern South America) and therefore support the hypothesis that this fact is related to the low vectorial competence of the ticks within the *R. sanguineus* taxon founded in this region, on the other hand, ticks within the *R. sanguineus* taxon found in Tropical Latin America show high vectorial competence in *E. canis* transmission.

Key words: dogs, ticks, *Rhipicephalus sanguineus*, vectorial competence, *Ehrlichia canis*.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de <i>R. sanguineus</i> de São Paulo, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	36
Tabela 2 - Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de <i>R. sanguineus</i> da Argentina, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	36
Tabela 3 - Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de <i>R. sanguineus</i> do Uruguai, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	36
Tabela 4 - Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de <i>R. sanguineus</i> do Rio Grande do Sul, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	36
Tabela 5 - Dados de hemograma do cão infestado com ninfas não infectadas das populações provenientes de São Paulo, Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão não infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	37
Tabela 6 - Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de <i>R. sanguineus</i> de São Paulo, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	37
Tabela 7 - Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de <i>R. sanguineus</i> de Uruguai, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	37
Tabela 8 - Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de <i>R. sanguineus</i> do Rio Grande do Sul, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	37
Tabela 9 - Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de <i>R. sanguineus</i> da Argentina, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	38

Tabela 10 - Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos não infectados das populações de São Paulo, Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão não infectado por <i>Ehrlichia canis</i>	38
Tabela 11 - Títulos finais de imunofluorescência indireta dos cães Jarinu e Theodoro, infestados no dia zero com adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> provenientes de São Paulo, expostos a <i>Ehrlichia canis</i> durante a alimentação ninfal.....	42
Tabela 12 - PCR em tempo real dos animais Jarinu e Theodoro, infestados no dia zero com adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> provenientes de São Paulo expostos a <i>Ehrlichia canis</i> durante a alimentação ninfal.....	43
Tabela 13 - PCR em tempo real dos carrapatos em fase de ninfa que se alimentaram em cão inoculado com <i>E. canis</i> (infectado) e em cão inoculado com placebo (controle) na fase de larva. Populações de carrapatos provenientes de São Paulo (SP controle e infectado), Argentina (ARG controle e infectado), Rio Grande do Sul (RS controle e infectado), Uruguai (URU controle e infectado).....	44
Tabela 14 - PCR em tempo real dos carrapatos adultos que se alimentaram em cão inoculado com <i>E. canis</i> (infectado) e em cão inoculado com placebo (controle) na fase de ninfa. Populações de carrapatos provenientes de São Paulo (SP infectado e controle), Argentina (ARG infectado e controle), Rio Grande do Sul (RS infectado e controle) e Uruguai (URU infectado e controle).....	44
Tabela 15 - PCR em tempo real para detecção de <i>Ehrlichia canis</i> em carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> adultos provenientes de populações naturais de diferentes cidades do Brasil, e da Argentina e Uruguai.....	45
Tabela 16 - PCR em tempo real das glândulas salivares dos carrapatos em fase adulta, que se alimentaram em cão inoculado com <i>E. canis</i> na fase de ninfa, provenientes das populações de São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Rafaela, Argentina (ARG) e Montevideú, Uruguai (URU).....	46
Tabela 17 - PCR em tempo real das glândulas salivares dos carrapatos em fase adulta, infectados <i>in vitro</i> com <i>Ehrlichia canis</i> , provenientes das populações de São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Rafaela, Argentina (ARG) e Montevideú, Uruguai (URU).....	47

LISTA DE FIGURA E GRÁFICOS

Figura 1 - Esquema das infestações e procedimentos experimentais com cães e carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> no presente estudo.....	30
Gráfico 1 - Valores de eritrócitos (valores de referência: 5.5 a 8.5 milhões/mm ³) dos animais infestados com ninfas expostas a <i>E. canis</i> na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas CONTROLE).....	37
Gráfico 2 - Valores de hematócrito (valores de referência: 37 a 55%) dos animais infestados com ninfas expostas a <i>E. canis</i> na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas CONTROLE).....	38
Gráfico 3 - Valores de leucócitos (valores de referência: 6.000 a 15.000 milhões/mm ³) dos animais infestados com ninfas expostas a <i>E. canis</i> na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas CONTROLE).....	38
Gráfico 4 - Valores de plaquetas (valores de referência: 200.000 a 500.000 / mm ³) dos animais infestados com ninfas expostas a <i>E. canis</i> na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas CONTROLE).....	38
Gráfico 5 - Valores de eritrócitos (valores de referência: 5.5 a 8.5 milhões/mm ³) dos animais infestados com adultos expostos a <i>E. canis</i> na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultos SP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos CONTROLE).....	39
Gráfico 6 - Valores de hematócrito (valores de referência: 37 a 55%) dos animais infestados com adultos expostos a <i>E. canis</i> na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultos SP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos CONTROLE).....	39

Gráfico 7 - Valores de leucócitos (valores de referência: 6.000 a 15.000 milhões/mm ³) dos animais infestados com adultos expostos a <i>E. canis</i> na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultosSP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos CONTROLE).....	40
Gráfico 8 - Valores de plaquetas (valores de referência: 200 .000 a 500.000 / mm ³) dos animais infestados com adultos expostos a <i>E. canis</i> na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultosSP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos CONTROLE).....	40
Gráfico 9 - Prevalência da população de carrapatos provenientes de diferentes regiões do Brasil que foram positivos no PCR em tempo real para a bactéria <i>Ehrlichia canis</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ARG	Argentina
BA	Bahia
C	Citocina
CA	Los Angeles
CD3+	Aglomerado de diferenciação 3 de célula T de co-receptores
CD8+	Aglomerado de diferenciação 8 de célula T de co-receptores
DH82	Células macrofágicas de linhagem contínua de origem canina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dsb	Gene da proteína de formação da ligação dissulfeto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMC	Erliquiosemonocítica canina
EUA	Estados Unidos da América
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
G	Guanina
IgG	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
MO	Missouri
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
No.	Número
NT	Linhagem norte
PBS	Solução tampão fosfatada
PCR	Reação em cadeia polimerase
PE	Pernambuco

pH	Potencial de hidrogênio
PR	Paraná
rDNA	Ácido desoxirribonucléicoribossomal
RIFI	Imunofluorescência indireta
RO	Rondônia
rRNA	Ácido ribonucléicoribossomal
RS	Rio Grande do Sul
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipicephalussanguineus</i>
SP	São Paulo
SRD	Sem raça definida
ST	Linhagem sul
T	Timina
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
URU	Uruguai
VPS	Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal
Y	Pirimidina

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
°	Graus
%	Por cento
>	Maior
<	Menor
C	Celsius
+	Mais
:	Diluição
mm ³	Milímetro cúbico
*	Asterisco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>RHIPICEPHALUS SANGUINEUS</i>	19
1.2 <i>EHRLICHIA CANIS</i>	22
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTES	25
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 CARRAPATOS	27
4.2 CÃES	28
4.3 CEPAS DE <i>E. CANIS</i>	28
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
4.5 ANÁLISES MOLECULARES DE CARRAPATOS COLETADOS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL, ARGENTINA E URUGUAI	32
4.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	32
4.7 PCR EM TEMPO REAL	33
4.8 EXPOSIÇÃO IN VITRO DE CARRAPATOS A <i>E. CANIS</i>	33
5 RESULTADOS	35
5.1 CÃES INOCULADOS COM <i>E. CANIS</i> E INFESTADOS POR CARRAPATOS	35
5.2 CÃES INFESTADOS COM CARRAPATOS PREVIAMENTE EXPOSTOS ALIMENTAÇÃO EM CÃES INFECTADOS OU NÃO POR <i>E. CANIS</i>	35
5.2.1 HEMOGRAMA	35
5.2.2 TEMPERATURA RETAL	42
5.2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	42

5.2.4 PCR EM TEMPO REAL.....	43
5.3 PCR EM TEMPO REAL DE CARRAPATOS COLETADOS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.....	45
5.4 PCR EM TEMPO REAL DE GLÂNDULAS SALIVARES DOS CARRAPATOS.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	53
8 REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A fauna de carrapatos do Brasil está constituída por 61 espécies, divididas em duas famílias: Ixodidae (44 espécies) e Argasidae (17 espécies). A família Ixodidae é constituída por cinco gêneros, conforme descrito a seguir: *Amblyomma* (30 espécies), *Ixodes* (8 espécies), *Haemaphysalis* (3 espécies), *Dermacentor* (1 espécie) e *Rhipicephalus* (2 espécies). Todos esses carrapatos são nativos da América Latina, exceto as espécies *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ambos importados com animais domésticos (cães e bovinos, respectivamente) do Velho Mundo (GUIMARÃES et al., 2001; LABRUNA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2009).

Dentro do gênero *Rhipicephalus*, há o chamado complexo *R. sanguineus*, formado por várias espécies, dentre as quais *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. camicasi* e *R. guilhoni* destacam como de maior importância veterinária na África e Europa (WALKER et al., 2000, 2003; ESTRADA-PEÑA et al., 2004). As espécies deste complexo apresentam grandes similaridades morfológicas, e algumas vezes ecológicas, distribuídas principalmente na África, região mediterrânea e Oriente Médio. Desta forma, a literatura relata inúmeros diagnósticos errôneos e confusões ocorridas em trabalhos envolvendo diferentes espécies do complexo *sanguineus* (WALKER et al., 2000). Por esta razão, o uso de ferramentas de biologia molecular vem sendo bastante apropriado para estudos com diferentes espécies do complexo *sanguineus*.

1.1. *Rhipicephalus sanguineus*

O carrapato *R. sanguineus* está presente em todos os continentes do planeta (exceto Antártida), onde parasita primariamente o cão doméstico. Embora ele tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo, levando consigo o cão doméstico (WALKER et al., 2000). A introdução do *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido recentemente, durante a colonização européia a partir do final do século 15, ou mesmo anteriormente, já que há relatos de fósseis de cães domésticos no Peru, Bolívia e México datados de antes do século 15 (LEONARD et al.,

2002). De qualquer forma, é possível que tenha havido múltiplas introduções em diferentes países do Novo Mundo, resultando em diferentes recombinações gênicas entre as populações estabelecidas (MORAES-FILHO et al., 2010).

No Brasil, *R.sanguineus* não era encontrado nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e na região Sul até antes de 1906, quando já era abundante na Bahia, Sergipe, Maranhão, Pará, Mato Grosso e em algumas localidades da cidade do Rio de Janeiro. De 1910 em diante, esta espécie tornou-se mais abundante no Rio de Janeiro e nos demais Estados das regiões Sudeste e Sul (ARAGÃO, 1911, 1936). Nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por *R.sanguineus* em cães vêm aumentando. No Rio Grande do Sul, por exemplo, este carrapato foi citado de baixa ocorrência em 1947, tendo sido encontrado em apenas 1 (1,29%) de 77 cães examinados (CORRÊA, 1955). Cinco décadas mais tarde, este mesmo carrapato foi encontrado em 48,8% de 450 cães da cidade de Porto Alegre (RIBEIRO et al., 1997). Atualmente, *R.sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (LABRUNA, 2004). Tal fato é retratado pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata este carrapato; até o início da década de 1980, não existia no mercado brasileiro nenhum produto comercial carrapaticida com indicação específica para tratamento de *R.sanguineus* em cães. Atualmente, há dezenas de produtos, das mais diversas formulações e apresentações, representando uma cifra considerável no faturamento da linha veterinária das indústrias farmacêuticas do Brasil.

Mesmo diante da existência do complexo *sanguineus* de espécies filogeneticamente muito próximas, *R.sanguineus* tem sido sempre considerada a única espécie de *Rhipicephalus* ocorrendo no Novo mundo (GUGLIELMONE et al., 2003; BARROS-BATTESTI et al., 2006). Recentemente, Szabó et al. (2005) relataram parâmetros biológicos e genéticos significativamente diferentes entre uma população de *R. sanguineus* do Brasil e uma da Argentina. Embora adultos da população brasileira tenham se alimentados e copulado com adultos da população da Argentina (e vice-versa), os híbridos se mostraram quase que totalmente inférteis. Em adição, análise de seqüências de DNA de um fragmento do gene mitocondrial 12S rRNA mostraram que a população argentina era mais próxima de *R. sanguineus* da Europa, ao passo que a população Brasileira era mais próxima de uma população de *R. turanicus* da África. Resultados semelhantes foram

obtidos por Burlini et al. (2010), ao constatarem por análises moleculares dos genes mitocondriais 16S rRNA e 12S rRNA, que carrapatos *R. sanguineus* de diferentes regiões do Brasil (Estados do Pará, Rondônia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Norte, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) apresentavam-se geneticamente relacionados a *R. turanicus* da África tropical, enquanto que carrapatos *R. sanguineus* da Argentina e Uruguai apresentavam-se geneticamente relacionados a *R. sanguineus* da Europa. Baseando-se nos seus resultados, Szabó et al. (2005) e Burlini et al. (2010) sugeriram que o status biosistemático de *R. sanguineus* deveria ser revisto, uma vez que haveria fortes evidências moleculares para a ocorrência de pelo menos duas espécies do chamado complexo *sanguineus* nas Américas.

Moraes-Filho et al. (2010) realizou uma análise filogenética através do gene 16S rRNA provenientes de 32 populações de *R. sanguineus*, sendo 17 do Brasil (englobando 13 estados), 3 do Chile, 2 da Venezuela, 2 da Colômbia e 1 de cada um dos seguintes países: Argentina, Uruguai, Itália, Espanha, África do Sul, Costa Rica, Panamá, México. Amostras de *Rhipicephalus turanicus* e *R. sanguineus* da Espanha e África do Sul também foram analisadas. O resultado deste trabalho permitiu inferir sobre a possibilidade da existência no mínimo de dois grupos distintos de carrapatos sob o táxon *R. sanguineus* na América Latina: um se aproximando dos carrapatos *R. sanguineus* e *R. turanicus* de origem africana e com distribuição na América tropical e subtropical (México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela e os seguintes Estados Brasileiros: Amapá, Rondônia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Paraíba, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina); outro se aproximando das amostras europeias de *R. sanguineus* e *R. turanicus*, com distribuição temperada, ao sul da América do Sul (Chile, Argentina, Uruguai e o estado Brasileiro do Rio Grande do Sul). Muito embora esses estudos indiquem a existência de duas espécies geneticamente distintas de *Rhipicephalus* do complexo *sanguineus* no Novo Mundo, novas análises moleculares, morfológicas, biológicas e ecológicas, englobando carrapatos das localidades tipos de espécies do complexo *sanguineus* no Velho Mundo, deverão ser feitas para melhor definição das espécies do complexo *sanguineus* que ocorrem no Novo Mundo (Moraes-Filho et al. 2010).

Nava et al. (2012), em uma análise genética de seqüências parciais de genes rDNA mitocondriais 16S e 12S de *R. sanguineus* coletadas no Cone Sul da América do Sul, e

seqüências de carrapatos pertencentes a este taxon da Europa, África e outras localidades da América do Sul também foram incluídos. Os resultados filogenéticos revelaram dois grupos de haplótipos, ou seja, um de linhagem sul (ST) e outra de linhagem Norte (NT). Os espécimes provenientes de localidades da Argentina, Uruguai e Chile foram incluídos na linhagem ST, enquanto os do Brasil, Paraguai, Colômbia, África do Sul, Moçambique e de duas localidades do norte da Argentina foram agrupados na linhagem NT. As árvores filogenéticas obtidas com ambas as seqüências de 16S e 12S mostraram dois clados distintos, um contendo *R. sanguineus* da Argentina, Uruguai, Chile (linhagem ST) e Europa Ocidental (Itália e França), e um segundo clado incluindo *R. sanguineus* da Argentina, Paraguai, Brasil, Colômbia (linhagem NT), África do Sul e Moçambique.

1.2. *Ehrlichia canis*

Em diferentes partes do mundo, incluindo o continente americano, o carrapato *R. sanguineus* é o vetor principal, se não o único, da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC) (DUMLER et al., 2001). A EMC no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada por muitos como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais, principalmente pela elevada e disseminada infestação do carrapato vetor, pela inexistência de vacina, pela inexistência de imunidade adquirida eficiente, e pela complexidade, e muitas vezes ineficiência, dos protocolos terapêuticos (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; MACHADO 2004; AGUIAR et al. 2007b). Vale salientar que casos de infecção humana por *E. canis* foram recentemente reportados na Venezuela, estando estes associados ao carrapato *R. sanguineus* (UNVER et al., 2001; PEREZ et al., 1996, 2006). Esses estudos indicam que a EMC possa também ser uma zoonose.

No carrapato *R. sanguineus*, há transmissão transtadial de *E. canis*, mas não transovariana (GROVES et al., 1975; DUMLER et al. 2001). As larvas e ninfas se infectam ao alimentarem-se em cães infectados na fase aguda da doença, mantendo-se infectadas até o estágio adulto (LEWIS et al., 1977). No carrapato o microorganismo se dissemina em hemócitos, para a glândula salivar, e a infecção do hospedeiro ocorre através das secreções salivares no sítio de alimentação do vetor (MACHADO, 2004; HARRUS et al., 1997).

Ao ser inoculada na pele de um cão através de secreções salivares do carrapato, a bactéria *E. canis* penetra nas células mononucleares sob a forma de corpúsculos elementares. Posteriormente, multiplica-se nos fagolisossomos celulares desenvolvendo seguidamente em dois estágios, os corpúsculos iniciais e as mórulas (POPOV et al., 1998; SANTAREM, 2003). A patogenia da erliquiose canina envolve um período de incubação de oito a 20 dias. A doença é caracterizada por ser multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica. Em infecções experimentais, é possível diferenciar as três fases, mas em animais naturalmente infectados, é difícil definir a fase da doença, uma vez que a apresentação clínica e os achados laboratoriais são similares, bem como a duração e severidade dos sinais clínicos é variável (HARRUS et al., 1997; SANTAREM, 2003).

Mecanismos inflamatórios e imunológicos estão envolvidos na patogenia da doença. Estes incluem intensa infiltração leucocitária em órgãos parenquimatosos, manguitos perivasculares (particularmente nos pulmões, rins, baços, meninges e olhos), hemaglutinação e hipergamaglobulinemia. A demonstração de anticorpos anti-plaquetários em cães experimentalmente infectados por *E. canis* reforça a teoria de que a doença possuiu um componente imunopatológico (HARRUS et al., 1997). No Brasil, o isolado Jaboticabal de *E. canis* foi estudado do ponto de vista clínico, patológico e imunológico (CASTRO, 2004; HASEGAWA, 2005), onde foi confirmada a teoria do envolvimento imunopatológico na erliquiose canina.

O carrapato se infecta ao ingerir leucócitos circulantes contendo o agente. Isto geralmente ocorre na segunda ou terceira semana de infecção do cão (fase aguda), pois no início há maior quantidade de leucócitos infectados. A *E. canis* se multiplica nas células epiteliais do intestino, hemócitos e nas células das glândulas salivares. Ocorre transmissão transestadial, mas não transovariana, fazendo do cão o principal reservatório do agente. Dessa forma, a transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre pelos estágios de ninfa e adulto (GROVES et al., 1975). Bremer et al. (2005) experimentalmente demonstraram que machos adultos de *R. sanguineus*, sem a presença da fêmea, podem se infectar e transmitir (transmissão intraestadial) a doença a diferentes cães de um mesmo local. O papel do macho transmissor de um cão para outro (transmissão intraestadial) foi recentemente confirmado em um estudo sob condições naturais de um canil (LITTLE et al., 2007).

Castro et al. (2004) estudaram cães inoculados com *E. canis* para avaliar os sinais clínicos, as respostas imunes humoral e celular e alterações microscópicas dos tecidos resultante da infecção aguda experimental. Quatro cães foram inoculados com *E. canis* e quatro foram usadas como controles não infectados. Depois de um período de incubação em torno de 14 dias, os cães infectados desenvolveram pirexia de até 41°C por 6 a 8 dias. Os títulos de anticorpos para o antígeno *E. canis* foram comprovados em todos os animais inoculados aos 30 dias pós-infecção. A necropsia destes animais infectados revelou mucosas pálidas, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, edema e ascite. Microscopicamente, as lesões principais foram: hiperplasia linforeticular na cortical, áreas de nódulos linfáticos e da polpa branca esplênica, a acumulação de células mononucleares periportal e degeneração gordurosa centro-lobular ou do fígado. Os rins apresentaram glomerulonefrite caracterizada por infiltração mononuclear intersticial. A imunofenotipagem de linfócitos de linfonodos e secções de baço apresentaram alterações na IgG, IgM, CD3 + e de células CD8 + da população dos cães infectados.

No Brasil, a EMC ocorre endemicamente em praticamente todas as cinco regiões, com frequências de infecção geralmente entre 20 e 50% em populações caninas amostradas de forma aleatória, sem suspeita clínica (LABARTHE et al., 2003, AGUIAR et al., 2007b; COSTA Jr. et al., 2007; TRAPP et al., 2006; SANTOS et al., 2009; VIERA et al., 2011). No entanto, a região Sul apresenta um viés, isto é, enquanto o norte do Estado do Paraná apresenta frequências de infecções >20% (DAGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006; VIERA et al., 2011), semelhantemente às demais regiões do Brasil, os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentam frequências mínimas, <5% (LABARTHE et al., 2003; SAITO et al., 2008; VIERA et al., 2011, Krawczak et al., 2012). As razões para essas diferenças permanecem desconhecidas. Pelo menos no tocante à exposição a carrapatos, sabe-se que os cães do Rio Grande do Sul são frequentemente parasitados por *R. sanguineus*, conforme apontado em diferentes trabalhos (RIBEIRO et al., 1997, EVANS et al., 2000) e informado por diferentes colegas naquele estado (informações pessoais).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A partir dos trabalhos de Szabó et al. (2005); Burlini et al. (2010); Moraes-Filho et al. (2010) e Nava et al. (2013), é notório que os carrapatos *R. sanguineus* da chamada América Latina temperada (Chile, Argentina, Uruguai e estado do Rio Grande do Sul) formam um grupo monofilético, claramente distinto de um segundo grupo monofilético, formado por *R. sanguineus* da chamada América Latina tropical (desde México ao estado Brasileiro de Santa Catarina), com claras possibilidades desses dois grupos estarem representados por duas espécies distintas dentro do complexo *sanguineus*.

Estudos sobre EMC realizados na América Latina indicam que *E. canis* é altamente prevalente em países da América Latina tropical, tais como Costa Rica, México, Venezuela e Brasil (LABARTHE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007b). Por outro lado, casos de infecção canina por *E. canis* na América Latina temperada são raros ou ausentes, como constatados em trabalhos no Estado do Rio Grande do Sul (SAITO et al., 2008), no Uruguai, Chile e Argentina (GUGLIELMONE et al., 2003, GONZÁLES-ACUÑA et al., 2005, VENZAL et al., 2007).

Desta forma, a hipótese primária do presente projeto é que a ausência ou escassez de casos de EMC na América Latina temperada se deve à baixa competência vetorial dos carrapatos sob o taxon *R. sanguineus* presentes nessa região do Novo Mundo, ao contrário da América tropical, onde os carrapatos presentes sob o táxon *R. sanguineus* possuem alta competência vetorial.

3 OBJETIVOS

Baseado no exposto acima, o presente projeto possuiu como objetivo geral, avaliar de forma comparativa, a competência vetorial de quatro populações de *R.sanguineus* da região Neotropical, uma representando a América Latina tropical e três representando a América Latina temperada. Para tal, foram avaliados carrapatos derivados de uma população de *R.sanguineus* de Rafaela, Argentina (América Latina temperada), uma de Cachoeira do Sul, Estado do Rio Grande do Sul (América Latina temperada), uma terceira da cidade de Montevideu, Uruguai (América Latina temperada), e uma quarta da cidade de São Paulo, Brasil (América Latina tropical). Esse objetivo pode ser dividido nos seguintes objetivos específicos:

- (i) determinar as frequências de infecção por *E. canis* em ninfas e adultos de *R. sanguineus* da Argentina, Uruguai, Cachoeira do Sul-RS e São Paulo-SP, após se alimentarem no estágio anterior em cães em fase aguda de EMC;
- (ii) avaliar a capacidade desses carrapatos potencialmente infectados por *E. canis* transmitirem a bactéria durante o repasto sanguíneo para cães saudáveis;
- (iii) avaliar a susceptibilidade das quatro populações de *R.sanguineus* à infecção por *E. canis*, após exposição *in vitro* a uma alimentação altamente concentrada de *E. canis*.
- (iv) determinar a frequência de *E. canis* em populações de *R. sanguineus* coletados a campo em no Brasil, Argentina e Uruguai.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Carrapatos

Fêmeas ingurgitadas de carrapatos identificados como *R.sanguineus*, conforme literatura vigente para a região Neotropical (BARROS-BATTESTI et al., 2006), foram obtidas de cães naturalmente infestados nos municípios de Rafaela (Argentina), Cachoeira do Sul (RS, Brasil), São Paulo (SP, Brasil) e Montevideu (Uruguai). Em trabalho anterior (MORAES-FILHO et al., 2010), os carrapatos *R. sanguineus* dessas localidades mostraram-se geneticamente distintos, sendo o argentino, uruguaio e o gaúcho pertencentes ao grupo América Latina temperada, e o paulista pertencente ao grupo América Latina tropical. No laboratório, as fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em incubadora a 27°C e umidade relativa ao redor de 85%, para oviposição e eclosão das larvas. Parte dessas larvas foi infestada em coelhos domésticos não infectados para obtenção de ninfas, de forma que larvas e ninfas não alimentadas ficaram disponíveis ao mesmo tempo para início das infestações em cães (descrito abaixo). Desta forma, o presente trabalho foi realizado com carrapatos de primeira geração de laboratório. Durante a execução do presente projeto, todas as fases subsequentes de vida livre do carrapato foram acompanhadas nas condições da incubadora citada acima.

4.2 Cães

Foram utilizados 16 cães adultos da raça Beagle e 6 cães adultos sem raça definida (SRD), sem histórico de presença de carrapatos e tampouco infecção por *E. canis*. Os cães foram provenientes do biotério experimental do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Uma semana antes do início dos experimentos, a ausência de infecção por *E. canis* nos cães foi confirmada através de pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* pela técnica de imunofluorescência indireta (técnica descrita no item 4.6) e ausência de DNA de *E. canis* em sangue circulante, através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real (técnica descrita no item

4.7). Os cães foram mantidos no canil experimental do VPS na FMVZ/USP – Campus de Pirassununga, durante todo o experimento.

4.3 Cepas de *E. canis*

A infecção experimental dos cães por *E. canis* no presente estudo foi realizada com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado (UNESP – Campus Jaboticabal). Esta cepa, mantida através de passagens em cães com inoculações de sangue canino infectado, sem qualquer passagem in vitro, se mostrou altamente patogênica para cães infectados experimentalmente (CASTRO, 2004; HASEGAWA, 2005). Para os protocolos de infecção in vitro de carrapatos e produção de antígeno para imunofluorescência indireta (RIFI), foi utilizada a cepa São Paulo, conforme descrito por (AGUIAR et al., 2007a).

4.4 Delineamento experimental

Seis cães foram inoculados pela via intra-venosa, sendo três cães com amostra de sangue canino infectado com *E. canis* (cepa Jaboticabal), conforme previamente descrito (CASTRO, 2004) e os outros três com placebo não infectado (grupo controle). Os animais foram acompanhados diariamente quanto à temperatura retal e demais alterações clínicas. No primeiro dia de febre após inoculação (início da fase aguda da doença) dos três animais que receberam *E. canis*, foi coletada amostra de sangue total de cada cão, para pesquisa de DNA de *E. canis* por PCR em tempo real (técnica descrita abaixo), que foi processada no mesmo dia de coleta. Sendo os resultados do PCR em tempo real positivos, todos os seis cães (3 infectados, e 3 controles não infectados) foram infestados com carrapatos, sendo 1 cão infectado e outro não infectado com larvas de *R. sanguineus* provenientes de quatro populações (São Paulo, Rio Grande do Sul, Uruguai, Argentina), e dois cães infectados e outros dois não infectados com ninfas das mesmas quatro populações. Para tal, foram montadas e coladas quatro câmaras de infestação de tecido de algodão ao dorso tricotomizado de cada um dos seis cães (cada câmara recebendo uma população diferente de *R. sanguineus*, de forma que não se misturassem), conforme descrito anteriormente

(PINTER et al., 2002). Nos cães infestados com larvas, cada câmara recebeu 1000 larvas de *R.sanguineus*; nos cães infestados com ninfas, cada câmara recebeu 300 ninfas de *R.sanguineus*. As larvas e ninfas ingurgitadas foram recuperadas diariamente e colocadas em incubadora para realizarem ecdise para ninfas e adultos, respectivamente. Os cães do grupo controle não apresentaram febre em nenhum momento, sendo que suas infestações foram realizadas no mesmo dia das infestações dos dois cães febris, infectados via venosa. Os carrapatos recuperados nesses cães controles foram mantidos nas mesmas condições daqueles obtidos dos cães infectados.

Após ecdise, amostras de pelo menos 100 ninfas e 100 adultos em jejum de cada colônia (Argentina, Uruguai, Rio Grande do Sul, São Paulo), oriundos de alimentação nos três cães infectados e nos três cães não infectados, foram separados e congelados a -20°C, para serem submetidos a análises moleculares, conforme descrito abaixo. Os resultados de PCR em tempo real para *E. canis* nos carrapatos serviram para determinar a frequência de carrapatos que se infectaram por *E. canis*, após se alimentarem em cães infectados por *E. canis*.

Com o intuito de avaliar a persistência da infecção por *E. canis* nos carrapatos após a ecdise de ninfas para adultos das populações de São Paulo e Rio Grande do Sul, amostras de carrapatos adultos foram processadas aos 7 e aos 30 dias pós-ecdise; no caso da população do Rio Grande do Sul, uma amostra adicional foi testada aos 90 dias pós-ecdise, totalizando 285 a 300 carrapatos adultos dessas duas populações.

As demais ninfas e adultos obtidos das infestações nos cães com larvas e ninfas, respectivamente, foram utilizados em infestações de 15 cães não infectados. Para os carrapatos expostos aos três cães infectados por *E. canis*, as seguintes infestações foram realizadas:

- um cão infestado com 200 ninfas oriundas de larvas da Argentina;
- um cão infestado com 200 ninfas oriundas de larvas do Rio Grande do Sul;
- um cão infestado com 200 ninfas oriundas de larvas de São Paulo;
- um cão infestado com 200 ninfas oriundas de larvas do Uruguai;
- dois cães infestados com 100 adultos oriundos de ninfas da Argentina;
- dois cães infestados com 100 adultos oriundos de ninfas do Rio Grande do Sul;
- dois cães infestados com 100 adultos oriundos de ninfas de São Paulo;

-dois cães infestados com 100 adultos oriundos de ninfas do Uruguai.

Para os carrapatos expostos aos cães não infectados (controle), um cão foi infestado simultaneamente com 100 ninfas de cada uma das quatro colônias (Argentina, Uruguai, Rio Grande do Sul, São Paulo) e dois cães foram infestados simultaneamente com 50 adultos de cada uma das quatro colônias (Argentina, Uruguai, Rio Grande do Sul, São Paulo). Os esquemas desses protocolos de infestações estão ilustrados na Figura 1.

Desde o dia da infestação até o dia +60, os cães foram monitorados diariamente quanto à temperatura retal e quaisquer outras alterações clínicas. Amostras de sangue em EDTA foram colhidas a intervalos semanais para realização de hemograma, incluindo contagem de plaquetas, e determinação de títulos de anticorpos anti-*E. canise* presença de DNA de *E. canis* através de PCR em tempo real.

No quarto de dia de alimentação nos cães, machos e fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas foram removidas dos cães e dissecadas para obtenção de suas glândulas salivares. De cada fêmea, as glândulas salivares foram submetidas à extração de DNA e realizado PCR em tempo real.

Figura 1: Esquema das infestações e procedimentos experimentais com cães e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* no presente estudo

4.5 Análises molecularesde carrapatos coletados de diferentes regiões do Brasil e Argentina e Uruguai

Foram realizadas análises moleculares de carrapatos coletados diretamente do “campo” (ambiente e animais) de diferentes regiões do Brasil, através da técnica de PCR em tempo real (técnica será descrita abaixo, no item 4.7). Estes carrapatos foram coletados por diferentes colegas em diferentes épocas do ano entre 2010 e 2012, e enviados ao Laboratório de Doenças Parasitárias onde foram mantidos em isopropanol 100% em temperatura ambiente até o processamento para extração de DNA (descrito abaixo). Os carrapatos foram coletados das seguintes cidades: São Paulo, SP; Cuiabá, MT; Campo Grande, MS; Paulo Afonso, BA; Cachoeira do Sul, RS; São Luís, MA; Uberlândia, MG; Bandeirantes, PR; Petrolina, PE; Ji-Paraná, RO; Montevideu, Uruguai e Rafaela, Argentina.

4.6 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As amostras de soro dos animais deste trabalho foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção e titulação de anticorpos anti-*E. canis*. O antígeno que foi utilizado para a reação foi obtido a partir de cultivo em células DH82, mantidas no Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS-FMVZ/USP, infectadas previamente com a cepa São Paulo de *E. canis*(AGUIAR et al., 2008). As amostras de soro, diluídas de forma seriada em Solução Tampão Fosfatada (PBS) pH 7,2, na razão dois a partir de 1:40, foram colocadas sobre a lâmina, incubadas a 37° por 30 minutos. Após lavagens de 5 minutos com solução de PBS, foi adicionado conjugado anti-IgG de cão (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a cada amostra e novamente foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Após lavagens em solução de PBS, as lâminas foram preparadas com glicerina tamponada, coberta com lamínula, para visualização em microscópio de fluorescência. Em cada lâmina foram testados soros testemunhas de títulos positivos e negativos conhecidos.

4.7 PCR em tempo real

As amostras de sangue total foram processados individualmente à extração de DNA, utilizando-se o “kit” de extração “DneasyTissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante. Os carrapatos e suas glândulas salivares foram processados pelo protocolo descrito por Sangioniet al. (2005), com uso de isotiocianato de guanidina seguido de fenol-clorofórmio. Os materiais obtidos da extração (carrapatos e sangue canino) foram testados para presença de DNA específico de *E. canis* através de um protocolo de PCR em tempo real utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Dsb-321 (5'-TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA - 3'), Dsb-671 (5' - GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA - 3'), e a sonda TaqMan (5'-AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA - 3'), 5' FAM/BHQ - 1 3', específica para a espécie *E. canis*, conforme previamente padronizado (DOYLE et al., 2005). A reação foi realizada em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por minuto, conforme descrito por DOYLE et al. (2005). A amplificação, aquisição e análise de dados foram realizadas em um sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems – AppliedBioSystems, Foster City, CA, EUA).

4.8 Exposição in vitro de carrapatos a *E. canis*

Carrapatos adultos não alimentados, das quatro populações de *R.sanguineus* estudadas, foram inoculados pela via intracelomática com suspensão de células DH82 infectadas com *E. canis*. Para tal, os carrapatos foram imobilizados em decúbito dorsal em fita de dupla face e a inoculação foi feita utilizando-se seringa e agulha de insulina através da articulação da coxa com o trocânter IV, conforme previamente descrito (SANGIONI et al., 2005, REHAV et al., 1999). Cada carrapato foi inoculado com cerca de 2 µl da suspensão contendo aproximadamente 200 células infectadas/µl. Após ficarem incubados por 10 dias numa incubadora BOD a 25°C, se alimentaram por cinco dias em coelhos, quando então foram manualmente retirados e tiveram suas glândulas salivares dissecadas e

submetidas a extração de DNA e PCR em tempo real, conforme descrito acima.

5 RESULTADOS

5.1 Cães inoculados com *E. canis* infestados por carrapatos

Os seis cães experimentalmente inoculados com a cepa Jaboticabal de *E. canispela* via endovenosa apresentaram febre (temperatura retal $>40^{\circ}\text{C}$) a partir do 14º dia pós-inoculação, quando suas respectivas amostras de sangue foram também positivas para *E. canispela* PCR em tempo real e para anticorpos IgG anti-*E. canispela* RIFI, com títulos de IgG de 640 a 1280. Esses mesmos cães foram negativos na PCR e RIFI no dia zero, através de amostras de sangue colhidas antes da inoculação endovenosa com *E. canis*. Quando testados novamente no 28º dia após inoculação, os três cães foram positivos na PCR e na RIFI, com títulos de IgG de 10240 a 20480. Esses cães foram infestados por carrapatos não infectados das quatro populações, no 15º dia após inoculação endovenosa, sendo que todo o período de alimentação (3 a 6 dias) de larvas e ninfas se deu com os cães em estado febril. Das larvas e ninfas ingurgitadas recuperadas, foram obtidas ninfas e adultos, respectivamente, que foram usados nas infestações experimentais descritas a seguir, com o intuito de avaliar a competência vetorial para *E. canis* das quatro populações de *R. sanguineus* testadas.

5.2 Cães infestados com carrapatos previamente expostos à alimentação em cães infectados ou não por *E. canis*

5.2.1 Hemograma

Todos os animais infestados por ninfas e adultos que se alimentaram nas fases de larvas e ninfas, respectivamente, em cães infectados por *E. canis*, apresentaram hemograma dentro dos parâmetros normais clínicos durante 60 dias pós infestação (Tabelas 1-4, 7-9), com exceção dos dois cães que foram infestados com carrapatos adultos da população proveniente de São Paulo (Tabela 6, Gráficos 1-8), nos quais houve redução no número de eritrócitos, hematócrito e plaquetas abaixo dos valores mínimos de referência. Os cães alimentados por ninfas e adultos das quatro populações, não expostos a *E. canis* (grupos

controles), apresentaram hemograma dentro dos valores normais (Tabelas 5, 10).

Tabela 1: Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de *R. sanguineus* de São Paulo, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	6	13	20	29	35	42	49	56	Referência
Hemácias	7	7,5	6,75	7,57	6,77	6,6	6,55	5,87	6,3	5,0-8,0
Hematócrito	45	49	47	48	47	45	43	43	44	37-54
Hemoglobina	14,8	15,4	15,3	15,1	15,2	15,3	13,8	14	13,8	12,0-18,0
Leucocitos	13400	19000	14800	14800	13800	10800	14000	9200	14000	6000-15000
Linfócitos típicos	4422	4370	2960	4292	3036	3456	5600	2484	5700	1500-5000
Linfócitos atípicos	0	0	0	0	0	108	0	0	0	raros
Plaquetas	265.000	255.000	265.000	225.000	250.000	80.000	295.000	250.000	245.000	200-500

Tabela 2: Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de *R. sanguineus* da Argentina, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	6	13	20	29	35	42	49	56	Referência
Hemácias	6,37	6,47	6,47	6,72	6,7	6,1	6,5	6,3	6,8	5,0-8,0
Hematócrito	41	40	44	45	45	43	45	43	48	37-54
Hemoglobina	13,1	13,2	14,4	14	14,4	14	14,6	13,8	15,5	12,0-18,0
Leucocitos	11400	15400	15700	11800	15600	12000	12000	15800	9100	6000-15000
Linfócitos típicos	1482	2618	3768	2478	3900	2760	3960	3160	1729	1500-5000
Linfócitos atípicos	0	0	0	0	0	0	0	158	0	raros
Plaquetas	335.000	300.000	260.000	340.000	280.000	330.000	110.000	310.000	310.000	200-500

Tabela 3: Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de *R. sanguineus* do Uruguai, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	6	13	20	29	35	42	49	56	Referência
Hemácias	6,15	6,3	6,3	6,82	7,55	6,75	6,15	6,8	6,52	5,0-8,0
Hematócrito	42	43	42	47	48	48	43	43	44	37-54
Hemoglobina	13,4	13,7	13,5	15	15,7	15,9	13,8	13,8	14,5	12,0-18,0
Leucocitos	15800	10400	12700	15000	7000	13400	12000	14000	13000	6000-15000
Linfócitos típicos	4266	3744	3937	4350	2030	3216	3240	4340	3380	1500-5000
Linfócitos atípicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	raros
Plaquetas	300.000	410.000	165.000	285.000	50.000	345.000	360.000	355.000	410.000	200-500

Tabela 4: Dados de hemograma do cão infestado com ninfas de *R. sanguineus* do Rio Grande do Sul, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	6	13	20	29	35	42	49	56	Referência
Hemácias	5,9	6,07	6,4	6,25	6,4	6,3	6,45	6,45	6,35	5,0-8,0
Hematócrito	42	42	44	45	44	46	46	44	44	37-54
Hemoglobina	12,8	13,3	14,4	14,2	14,4	15,6	15,1	14	14	12,0-18,0
Leucocitos	19400	14600	13000	11600	11200	11800	16800	11800	14400	6000-15000
Linfócitos típicos	4462	6278	5590	5568	3696	4484	5544	4956	7056	1500-5000
Linfócitos atípicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	raros
Plaquetas	380.000	255.000	455.000	335.000	200.000	270.000	275.000	360.000	350.000	200-500

Tabela 5: Dados de hemograma do cão infestado com ninfas não infectadas das populações provenientes de São Paulo, Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, oriundas de larvas que se alimentaram sobre um cão não infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	6	13	20	29	35	42	49	56	Referência
Hemácias	6,45	6,45	6,9	7,25	7	6,8	7,15	7	6,75	5,0-8,0
Hematócrito	40	43	45	51	49	45	48	48	47	37-54
Hemoglobina	13,1	13,7	14,6	16,1	16	15,3	16,1	15,4	15	12,0-18,0
Leucocitos	12600	14200	12400	16200	10800	7400	12400	12800	8200	6000-15000
Linfócitos típicos	3276	2698	3472	4536	3348	2516	3472	3456	2132	1500-5000
Linfócitos atípicos	0	0	0	0	108	0	0	0	0	raros
Plaquetas	245.000	340.000	325.000	335.000	245.000	285.000	270.000	310.000	207.500	200-500

Tabela 6: Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de *R. sanguineus* de São Paulo, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	9	14	21	28	49	56	63	Referência
Hemácias	6,5	6,1	5,95	5,3	4,8	4,65	4,6	4,5	5,0-8,0
Hematócrito	43,3	43	39,3	36,4	36,1	36,6	35,5	34,6	37-54
Hemoglobina	14,2	14,1	13,4	12,6	11,9	11,5	12,7	12,6	12,0-18,0
Leucocitos	12567	10034	7267	7700	7467	7734	8800	8734	6000-15000
Linfócitos típicos	3348	852	1250	4410	2520	864	920	980	1500-5000
Linfócitos atípicos	0	0	50	0	72	0	0	0	raros
Plaquetas	374.000	348.000	147.000	135.000	68.000	90.000	121.000	165.000	200-500

Tabela 7: Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de *R. sanguineus* de Uruguai, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	9	14	21	28	49	56	63	Referência
Hemácias	6,55	6,3	7	7,2	5,75	6,65	6,7	6,8	5,0-8,0
Hematócrito	47	47,6	50,2	45,3	42,4	44,1	43	44,6	37-54
Hemoglobina	15,3	15,6	15,6	15,2	13,95	14,9	14,95	14,4	12,0-18,0
Leucocitos	14400	11550	8900	9550	10800	9200	9200	8000	6000-15000
Linfócitos típicos	4312	2130	2064	2900	3000	2924	2900	1800	1500-5000
Linfócitos atípicos	392	0	0	0	0	0	0	0	raros
Plaquetas	266.000	318.500	259.500	265.500	191.000	299.000	300.500	306.000	200-500

Tabela 8: Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de *R. sanguineus* do Rio Grande do Sul, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	9	14	21	28	49	56	63	Referência
Hemácias	6,65	6,3	6,55	6,27	5,75	6,55	6,6	6,8	5,0-8,0
Hematócrito	45,3	44,9	44,3	43	40,6	44,3	43,45	44,2	37-54
Hemoglobina	14,9	14,95	15	14,75	13,2	15,05	15,05	15,5	12,0-18,0
Leucocitos	9500	11600	13450	8800	9000	9650	9700	8400	6000-15000
Linfócitos típicos	2100	2130	5070	3870	3000	2478	2650	3200	1500-5000
Linfócitos atípicos	100	0	0	0	0	0	0	0	raros
Plaquetas	223.500	284.500	233.000	337.500	236.000	206.000	256.500	220.500	200-500

Tabela 9: Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos de *R. sanguineus* da Argentina, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	9	14	21	28	49	56	63	Referência
Hemácias	6,4	7,15	7,25	6,1	6,55	7,45	6,8	6,4	5,0-8,0
Hematocrito	47,4	49,6	49,1	44,4	47,9	43,5	43	44,7	37-54
Hemoglobina	15,2	15,5	15,6	15	13,6	14,95	15,1	15,75	12,0-18,0
Leucocitos	9800	11000	9150	9000	12650	11300	10600	9800	6000-15000
Linfocitos típicos	2394	2412	2300	2464	4356	4160	4320	3800	1500-5000
Linfocitos atípicos	0	0	0	0	0	0	0	0	raros
Plaquetas	296.000	310.000	227.500	208.500	265.000	260.000	281.500	240.500	200-500

Tabela 10: Valores médios de hemograma de dois cães infestados com adultos não infectados das populações de São Paulo, Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, oriundos de ninfas que se alimentaram sobre um cão não infectado por *Ehrlichia canis*

Hemograma/Dia	0	9	14	21	28	49	56	63	Referência
Hemácias	6,5	7,4	6,05	6,65	5,7	6,1	5,8	6,2	5,0-8,0
Hematocrito	45	47	44	45	39	47	48	51	37-54
Hemoglobina	14,1	15,1	14,4	14,6	12,3	15,5	15,8	16,2	12,0-18,0
Leucocitos	12800	11000	8000	9400	6400	11000	12000	11500	6000-15000
Linfocitos típicos	2432	2530	1680	2538	1408	3410	2800	3100	1500-5000
Linfocitos atípicos	0	110	0	0	64	0	0	0	raros
Plaquetas	255.000	330.000	257.000	265.000	240.000	265.000	270.000	285.000	200-500

Gráfico 1: Valores de eritrócitos (valores de referência: 5.5 a 8.5 milhões/mm³) dos cães infestados com ninfas expostas a *Ehrlichia canis* na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas Controle)

Gráfico 2: Valores de hematócrito (valores de referência: 37 a 55%) dos animais infestados com ninfas expostas a *Ehrlichia canis* na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas Controle)

Gráfico 3: Valores de leucócitos (valores de referência: 6.000 a 15.000 milhões/mm³) dos animais infestados com ninfas expostas a *Ehrlichia canis* na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas Controle)

Gráfico 4: Valores de plaquetas (valores de referência: 200.000 a 500.000/ mm³) dos animais infestados com ninfas expostas a *Ehrlichia canis* na fase de larva, das populações de São Paulo (ninfas SP), Rio Grande do Sul (ninfas RS), Argentina (ninfas ARG), Uruguai (ninfas URU) e Controle (ninfas Controle)

Gráfico 5: Valores de eritrócitos (valores de referência: 5.5 a 8.5 milhões/mm³) dos animais infestados com adultos expostos a *Ehrlichia canis* na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultosSP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos Controle)

Gráfico 6: Valores de hematócrito (valores de referência: 37 a 55%) dos animais infestados com adultos expostos a *Ehrlichia canis* na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultosSP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos Controle)

Gráfico 7: Valores de leucócitos (valores de referência: 6.000 a 15.000 milhões/mm³) dos animais infestados com adultos expostos a *Ehrlichia canis* na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultosSP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos Controle)

Gráfico 8: Valores de plaquetas (valores de referência: 200.000 a 500.000/mm³) dos animais infestados com adultos expostos a *Ehrlichia canis* na fase de ninfa, das populações de São Paulo (adultosSP), Rio Grande do Sul (adultos RS), Argentina (adultos ARG), Uruguai (adultos URU) e Controle (adultos Controle)

5.2.2 Temperatura retal

Nenhum dos 12 cães expostos a carrapatos que se alimentaram previamente nos cães febris infectados por *E. canis* apresentou febre durante os 60 dias de observação (temperatura retal nunca ultrapassou de 39,5°C). Da mesma forma, os três cães expostos a carrapatos do grupo controle não apresentaram febre.

5.2.3 Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os animais infestados com ninfas expostas a *E. canis* na fase de larva, das populações de São Paulo, Argentina, Uruguai e Rio Grande do Sul, se mantiveram soronegativos pela RIFI durante os 60 dias após a infestação. Os animais infestados com adultos expostos a *E. canis* na fase de ninfa, provenientes de São Paulo, Argentina, Rio Grande do Sul e Uruguai, também apresentaram-se soronegativos, com exceção aos animais infestados com a população de São Paulo, que soroconverteram a partir do 14º dia, com títulos finais de IgG variando de 160 a 40960 (Tabela 11).

Tabela 11: Títulos finais de imunofluorescência indireta dos cães Jarinu e Theodoro, infestados no dia zero com adultos de *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de São Paulo, expostos a *Ehrlichia canis* durante a alimentação ninfal

Dia/Animal	Jarinu	Theodoro
0	negativo	negativo
9	negativo	negativo
14	160	320
21	2560	10240
28	40960	10240
35	40960	20480
42	20480	20480
49	20480	10240
56	20480	10240
63	40960	5120

5.2.4 PCR em tempo real

Dos animais infestados na fase de ninfa e adulto, com carrapatos das quatro populações usadas neste estudo, nas quais se alimentaram em uma fase anterior do artrópode em um cão em fase aguda da doença, apenas os animais infestados com carrapatos provenientes de São Paulo na fase adulta apresentaram-se positivos para *E. canis* pela PCR em tempo real, a partir do 14º dia após a infestação (Tabela 14).

Tabela 12: PCR em tempo real dos animais Jarinu e Theodoro, infestados no dia zero com adultos de *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de São Paulo, expostos a *Ehrlichia canis* durante a alimentação ninfal

Dia	Theodoro	Jarinu
0	negativo	negativo
9	negativo	negativo
14	positivo	positivo
21	positivo	positivo
28	positivo	positivo
35	positivo	positivo
42	positivo	positivo
49	positivo	positivo
56	positivo	positivo
63	positivo	positivo

Após se alimentaram como larvas e ninfas em cães infectados por *E. canis*, ninfas e adultos em jejum das quatro populações de *R. sanguineus* estudadas foram testados pela PCR em tempo real para detecção de DNA de *E. canis*. Das ninfas, apenas 1 (1%) de 100 indivíduos da população de São Paulo foi positiva (Tabela 13). Dos adultos, 80 (28%) de 285 carrapatos de São Paulo e 16 (4%) de 400 adultos do Rio Grande do Sul foram positivos na PCR. No entanto, quando esses resultados são estratificados por idade do carrapato adulto (7, 30 e 90 dias após a ecdise), nota-se que todos os 16 carrapatos positivos do Rio Grande do Sul eram recém mudados, com apenas 7 dias pós muda. No caso dos 80 carrapatos positivos de São Paulo, 53 representam 26,5% dos 200 indivíduos testados aos 7 dias pós ecdise, ao passo que 27 representam 31,8% dos 85 indivíduos testados aos 30 dias pós ecdise (Tabela 14).

Tabela 13: PCR em tempo real dos carrapatos em fase de ninfa que se alimentaram em cão inoculado com *E. canis*(infectado) e em cão inoculado com placebo (controle) na fase de larva. Populações de carrapatos provenientes de São Paulo (SP controle e infectado), Argentina (ARG controle e infectado), Rio Grande do Sul (RS controle e infectado), Uruguai (URU controle e infectado)

POPULAÇÃO	FASE	No. Examinados	Positivos (%)
SP controle	NINFA	100	0
SP infectados	NINFA	100	1 (1)
ARG controle	NINFA	100	0
ARG infectados	NINFA	100	0
URU controle	NINFA	100	0
URU infectados	NINFA	100	0
RS controle	NINFA	100	0
RS infectados	NINFA	100	0

Tabela 14: PCR em tempo real dos carrapatos adultos que se alimentaram em cão inoculado com *E. canis*(infectado) e em cão inoculado com placebo (controle) na fase de ninfa. Populações de carrapatos provenientes de São Paulo (SP infectado e controle), Argentina (ARG infectado e controle), Rio Grande do Sul (RS infectado e controle) e Uruguai (URU infectado e controle)

POPULAÇÃO	Dia após ecdisse	No. Examinados	Positivos (%)
SP infectado	7	200	53 (26,5)
SP infectado	30	85	27 (31,8)
SP controle	7	200	0 (0)
RS infectado	7	200	16 (8)
RS infectado	30	100	0 (0)
RS infectado	90	100	0 (0)
RS controle	7	200	0 (0)
ARG infectado	7	200	0 (0)
ARG controle	7	173	0 (0)
URU Infectado	7	200	0 (0)
URU controle	7	200	0 (0)

5.3 PCR em tempo real de carrapatos coletados de diferentes regiões do Brasil

A PCR em tempo real realizada em carrapatos *R. sanguineus* provenientes da Argentina, Uruguai e diferentes regiões do Brasil revelou carrapatos positivos para *E. canis* em todas as localidades testadas, exceto Rafaela (Argentina), Montevideu (Uruguai), Cachoeira do Sul/RS e Campo Grande/MS. Nas demais áreas, a porcentagem de positividade variou de 2,0 a 7,94% (Tabela 15 e Gráfico 9).

Tabela 15: PCR em tempo real para detecção de *Ehrlichia canis* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* adultos provenientes de populações naturais de diferentes cidades do Brasil, e da Argentina e Uruguai

População	No. de examinados	Positivos (%)
São Paulo-SP	374	14 (3,75)
São Luís-MA	63	5 (7,94)
Petrolina-PB	330	16 (4,85)
Cuiabá-MT	57	2 (3,5)
Uberlândia-MG	209	8 (3,82)
Paulo Afonso-BA	150	3 (2)
Bandeirantes-PR	160	4 (2,5)
Ji-Paraná-RO	36	2 (5,6)
Campo Grande-MS	110	0 (0)
Cachoeira do Sul-RS	155	0 (0)
Rafaela-Argentina	150	0 (0)
Montevideu-Uruguai	50	0 (0)

Gráfico 9: Porcentagem de carrapatos adultos infectados por *Ehrlichia canis* em populações naturais de *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de diferentes cidades do Brasil e da Argentina (ARG) e Uruguai (URU)

5.4 PCR em tempo real de glândulas salivares dos carrapatos

Das glândulas salivares de carrapatos adultos provenientes das quatro populações descritas neste trabalho, que foram previamente expostos a *E. canis* na fase de ninfa em um cão infectado por *E. canis*, apenas 7 (35%) de 20 carrapatos da colônia de São Paulo apresentou positividade na PCR em tempo real para *E. canis* (Tabelas 16).

Tabela 16: PCR em tempo real das glândulas salivares dos carrapatos em fase adulta, que se alimentaram em cão inoculado com *E. canis* na fase de ninfa, provenientes das populações de São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Rafaela, Argentina (ARG) e Montevideú, Uruguai (URU)

POPULAÇÃO	FASE	No. Examinados	Positivos (%)
SP	ADULTOS	20	7 (35)
RS	ADULTOS	20	0 (0)
URU	ADULTOS	20	0 (0)
ARG	ADULTOS	20	0 (0)

Dos carrapatos inoculados pela via intracelomática com *E. canis* proveniente de cultivo celular, a glândula salivar de apenas 1 (10%) de 10 carrapatos da colônia de São Paulo foi positiva para *E. canis* pela PCR em tempo real, ao passo as glândulas dos

carrapatos da demais populações de *R. sanguineus* foram todas negativas na PCR (Tabela 17).

Tabela 17: PCR em tempo real das glândulas salivares dos carrapatos em fase adulta, infectados *in vitro* com *Ehrlichia canis*, provenientes das populações de São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Rafaela, Argentina (ARG) e Montevideú, Uruguai (URU)

POPULAÇÃO	FASE	No. Examinados	Positivos (%)
SP	ADULTOS	10	1 (10)
RS	ADULTOS	10	0
ARG	ADULTOS	10	0
URU	ADULTOS	10	0

6 DISCUSSÃO

A partir dos trabalhos de Szabó et al. (2005), Burlini et al. (2010), Moraes-Filho et al. (2010) e Nava et al. (2012), foi demonstrado que os carrapatos *R. sanguineus* da chamada América Latina temperada (Chile, Argentina, Uruguai e estado do Rio Grande do Sul) formam um grupo monofilético, claramente distinto de um segundo grupo monofilético, formado por *R. sanguineus* da chamada América Latina tropical (desde México ao estado Brasileiro de Santa Catarina). Em paralelo, estudos de soroprevalência de *E. canis* apresentaram frequências expressivas de cães infectados em países da América Latina tropical, tais como Costa Rica, México, Venezuela e Brasil (LABARTHE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007b), porém na América Latina temperada são raros ou ausentes, como constatados em trabalhos no Estado do Rio Grande do Sul (SAITO et al., 2008, KRAWCZAK et al., 2012), no Uruguai, Chile e Argentina (GUGLIELMONE et al., 2003, GONZÁLES-ACUÑA et al., 2005, VENZAL et al., 2007).

Os resultados de hemograma, imunofluorescência indireta e PCR em tempo real dos animais infestados com carrapatos na fase de ninfa e adulto, das populações do Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai, nos quais estes artrópodes se alimentaram em uma fase anterior em um cão em fase aguda de erliquiose, apresentaram os seguintes resultados: a) valores de hemograma dentro dos parâmetros normais; b) imunofluorescência indireta e PCR em tempo real todos negativos. Em relação aos resultados dos animais que foram infestados com carrapatos adultos provenientes de São Paulo: a) hemogramas com redução no número de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas; b) imunofluorescência indireta e PCR em tempo real positivos. Estes resultados encontrados mostram que os carrapatos adultos provenientes de São Paulo (América Latina tropical) possuem competência vetorial para transmitir *E. canis* para cães, mas os da população da América Latina temperada são incompetente para tal processo, em consonância com os dados sorológicos para *E. canis* encontrados na literatura em pesquisas feitas no Novo Mundo (LABARTHE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007b; GUGLIELMONE et al., 2003; GONZÁLES-ACUÑA et al., 2005; VENZAL et al., 2007, KRAWCZAK et al., 2012). De fato, enquanto há diversos trabalhos relatando por técnicas de biologia molecular e isolamento em cultivo celular a ocorrência da bactéria *E. canis* no Brasil, Venezuela e Costa Rica (ROMERO et al., 2011; VIEIRA et

al., 2011), dentro da área de distribuição da espécie tropical, não existe qualquer trabalho que confirme a ocorrência deste agente no cone sul da América do Sul, ou seja, dentro da área de distribuição da espécie temperada (VENZAL et al., 2007; VIEIRA et al., 2011). Desta forma, aplicando os resultados deste trabalho às condições de campo e baseando-se na literatura vigente, fica demonstrado que a baixa ou nula ocorrência de erliquiose canina monocítica no cone sul da América do Sul está associada à incapacidade vetorial das populações de carrapatos do complexo *R.sanguineus* presentes nesta região.

Os animais que foram inoculados via intravenosa com a bactéria *E. canis* apresentaram pirexia 14 dias após inoculação e sinais clínicos como apatia e anorexia, semelhantes aos dados encontrados por Castro et. al. (2004) e Hasegawa (2005), que também trabalharam com a cepa Jaboticabal de *E. canis*. No entanto, nenhum dos dois cães do presente estudo que adquiriram a infecção por *E. canis* através de *R. sanguineus* adultos da população de São Paulo não apresentaram pirexia, muito embora tiveram alterações hematológicas compatíveis. As razões para ausência de pirexia nesses cães permanecem desconhecidas.

Nenhum dos cães infestados com ninfas expostas a *E. canis* na fase de larva, das populações de São Paulo, Argentina, Uruguai e Rio Grande do Sul se infectou pelo agente, nem sequer apresentaram alterações hematológicas. Tal fato pode estar relacionado à baixa competência vetorial deste estágio para transmissão de *E. canis*, mesmo na população de São Paulo, da qual apenas 1% das ninfas se mostraram positivas na PCR após serem expostas a *E. canis* durante o estágio larval. Esses resultados diferem dos relatados por Groves et al. (1975) e Mathew et al. (1996), que relataram que a ninfa de *R. sanguineus* é capaz de transmitir *E. canis* a animais susceptíveis, após adquirir a infecção pela alimentação larval em um cão infectado. Uma vez que apenas uma parcela bem pequena (1%) das ninfas da população de São Paulo se mostrou positiva na PCR para *E. canis*, é possível que nenhuma ninfa infectada tenha conseguido completar a alimentação no único cão exposto a essas ninfas no presente trabalho, fazendo com que o cão permanecesse não infectado por *E. canis*.

Ao todo, 400 adultos não alimentados de *R.sanguineus* da colônia do estado do Rio Grande do Sul foram testados pela PCR para detecção de DNA de *E. canis*. Destes, 8% foram positivos sete dias pós ecdise, porém nenhum foi positivo aos 30 e 90 dias pós

ecdise. É digno de nota que carrapatos do mesmo lote que apresentou indivíduos positivos aos 7 dias pós ecdise foram usados para infestar um cão susceptível, que se manteve soronegativo e negativo na PCR para *E. canis*. Ainda em relação a estes carrapatos adultos provenientes do Rio Grande do sul, foram analisadas as glândulas salivares destes artrópodes em PCR em tempo real, onde não apresentaram positivities. Desta forma, a positividade na PCR para 8% dos carrapatos da população do Rio Grande do Sul sete dias após a ecdise, associada a negatividade dos carrapatos 30 e 90 dias após, sugerem que os resultados positivos na PCR estão associados a DNA residual de *E. canis* no intestino do carrapato, originário na alimentação ninfal em cão bacterêmico. Tal suposição é corroborada pelos valores de Ct (*Cyclethreshold*) observados para esses carrapatos positivos do Rio Grande do Sul, que foram acima de 32 ciclos, indicando baixa concentração de DNA de *E. canis*. Em contraste, os carrapatos positivos da população de São Paulo geralmente apresentaram valores de Ct entre 24 e 30 ciclos (dados não demonstrados).

Dos carrapatos adultos da população de São Paulo que foram testados pela PCR, após se alimentarem como ninfas em cães infectados por *E. canis*, 26,5% foram positivos sete dias pós ecdise. Aos 30 dias pós ecdise, 31,8% eram positivos. Em contraste com a população do Rio Grande do Sul, os carrapatos da população de São Paulo mantiveram a *E. canis* em seu organismo após a ecdise, de forma viável, pois foram capazes de transmiti-la a cães susceptíveis. Os testes de PCR em glândula salivar reforçam este achado, pois demonstram que a bactéria foi capaz de romper a barreira intestinal e migrar para a glândula salivar de carrapatos da população de São Paulo, porém não foram nos carrapatos do Rio Grande do Sul.

Quando os carrapatos foram inoculados pela via intracelomática com suspensão de células infectadas por *E. canis*, apenas um indivíduo da população de São Paulo teve sua glândula salivar positiva na PCR após um período de incubação e alimentação dos carrapatos adultos. Esses resultados foram de certa forma inesperados, pois a dose inoculada no carrapato correspondia a uma quantidade de bactéria muito maior à que os carrapatos estão normalmente expostos numa alimentação natural em cães infectados. Além disso, a inoculação intracelomática ignora o possível efeito da barreira intestinal contra a bactéria. Uma vez que esta inoculação foi feita com *E. canis* de cultivo celular (cepa São

Paulo), é possível que esta cepa tenha perdido parte de sua infectividade para carrapatos. Tal fato foi demonstrado por Mathew et al. (1996), que reportaram uma cepa de *E. canis* que perdeu sua infectividade para carrapatos após sua adaptação a cultivo *in vitro* em células DH82.

Amostras de carrapatos coletados de diferentes regiões do Brasil foram analisadas através da técnica de PCR em tempo real para verificar a presença da bactéria *E. canis*. Foram coletados *R. sanguineus* de diferentes cidades brasileiras, englobando as cinco grandes regiões geográficas do país. Como esperado, carrapatos infectados foram encontrados na região Sudeste (São Paulo, SP; Uberlândia, MG), Nordeste (Paulo Afonso, BA; Petrolina, PE; São Luís, MA), Norte (Ji-Paraná, RO), Centro-Oeste (Cuiabá, MT) e norte da região Sul (Bandeirantes, PR), com frequência de positividade entre 2 e 7,94%. Esses resultados foram similares aos relatados por Aguiar et al. (2007b), que relataram 2,4% de carrapatos *R. sanguineus* infectados por *E. canis* numa população de Monte Negro, RO, 6,2% para uma população de Jundiá, SP, e 3,7% para uma população de São Paulo, SP. Por outro lado, todos os carrapatos de Campo Grande, MS, Cachoeira do Sul, RS, Rafaela (Argentina) e Montevideu (Uruguai) foram negativos. À exceção dos carrapatos de Campo Grande, os demais estão de acordo com a literatura vigente (VENZAL et al., 2007; VIEIRA et al., 2011) e com os ensaios de infecção experimental do presente trabalho, que demonstraram que os carrapatos do cone sul da América do Sul não são vetores competentes de *E. canis*. Por outro lado, a negatividade observada nos carrapatos de Campo Grande, área de distribuição da espécie tropical de *R. sanguineus*, pode estar meramente relacionada ao fato dos carrapatos terem sido colhidos ao acaso numa área onde não havia cães infectados, fonte obrigatória para infecção por *E. canis* em cães, uma vez que não há transmissão transovariana desta bactéria em carrapatos (GROVES et al., 1975).

Segundo os trabalhos de Szabó et al. (2005), Oliveira et al. (2005), Burlini et al. (2010), Moraes-Filho et al. (2010) e Nava et al. (2012), há pelo menos duas espécies do grupo *R. sanguineus* no Novo Mundo (América Latina temperada e tropical) que são diferentes do ponto de vista genético, biológico e morfológico. O presente trabalho demonstra que essas espécies também se diferenciam na competência vetorial para *E. canis*. Esses dados explicam os resultados contrastantes na ocorrência de cães infectados por *E. canis* no Novo Mundo (LABARTHE et al., 2003; AGUIAR et al., 2007b; VIEIRA et al.,

2011; SAITO et al., 2008; GUGLIELMONE et al., 2003; GONZÁLES-ACUÑA et al., 2005; VENZAL et al., 2007).

7 CONCLUSÃO

-Dentro das espécies do grupo *R.sanguineus* da América do Sul, testadas no presente trabalho, somente carrapatos do estado de São Paulo, representando a espécie tropical, se mostraram susceptíveis à infecção por *E. canis*. Carrapatos do Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai (representantes da espécie temperada) se mostraram refratários à infecção por esta bactéria.

-Ninfas de *R.sanguineus* de São Paulo (população tropical) se mostraram mais susceptíveis que larvas à infecção por *E. canis*.

-Somente carrapatos representantes da espécie tropical (São Paulo) se mostraram vetores competentes de *E. canis*; carrapatos do Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai (representantes da espécie temperada) foram vetores incompetentes.

-Os resultados de infecções experimentais foram corroborados pelos resultados de carrapatos colhidos no campo, uma vez que populações naturais do grupo *R.sanguineus* na América do Sul, colhidos dentro da área de distribuição geográfica da espécie tropical, apresentam infecção por *E. canis*, ao passo que esta bactéria não foi encontrada em populações naturais dentro da área de distribuição geográfica da espécie temperada.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007a.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007b.
- AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489-493, 2008.
- ARAGÃO, H. B. Notas sobre ixódidos brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 145-195, 1911.
- ARAGÃO, H. Ixodidos brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.
- BARROS-BATTESTI, D. M., ARZUA, M. & BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223 p.
- BREMER, W. G., SCHAEFER, J. J., WAGNER, E. R., EWING, S. A., RIKIHISA, Y., NEEDHAM, G. R., JITTAPALONG, 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., KIOMI TAKAHIRA, R., PESSOA ARAUJO, J., WIEDMEYER, 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.
- BURLINI, L., TEIXEIRA, K. R., SZABO, M. P., FAMADAS, K. M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, N. 4, p. 361-74, 2010.
- CASTRO, M. B. **Avaliação histopatológica e caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em órgãos linfóides e lesões na infecção aguda experimental em cães por Ehrlichia canis**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Medicina Veterinária, 2007.

- CASTRO, M. B., MACHADO, R. Z., AQUINO, L. P., ALESSI, A. C., COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 73–86, 2004.
- CORREA, O. 1955. Carrapatos determinados no Rio Grande do Sul. *Biologia, Patologia e Controle*. **Arquivo Instituto Pesquisa**, v. 1, p. 35-50, 1995.
- COSTA, J. R., REMBECK, K., RIBEIRO, M. F. B., BEELITZ, P., PFISTER, K., PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.
- DAGNONE, A.S., DE MORAIS, H.S., VIDOTTO, M.C., JOJIMA, F.S., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 285-290, 2003.
- DANTAS-TORRES, F., ONOFRIO, V. C., BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 14, p. 30-49, 2009.
- DOYLE, C.K., LABRUNA, M.B., BREITSCHWERDT, E.B., TANG, Y.W., CORSTVET, R.E., HEGARTY, B.C., BLOCH, K. C., LI, P., WALKER, D. H., MCBRIDE, J. W. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, p. 504-510, 2005.
- 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.
- ESTRADA-PENÑA, A., BOUATTOR, A., CAMICAS, J. L., WALKER, A. R. **Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species**. Atalanta, /ICTTD-2/, 2004, 131 p.
- EVANS, D.E., MARTINS, J. R., GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p. 453-470, 2000.
- GONZALEZ-ACUÑA, D., GUGLIELMONE, A. A. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of Chile. **Exp Appl Acarol**, v. 35(1-2), p. 147-63, 2005.
- GROVES, M.G., DENNIS, G.L., AMYX, H. L., HUXSOLL, D. L. Transmission of

- Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 937-940, 1975.
- GUGLIELMONE, A.A., ESTRADA-PENÑA, A., KEIRANS, J. E., ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographical region**. Houten, Holanda, ICTTD-2, 2003, 173 p.
- GUIMARÃES, J. H., TUCCI, E. C., BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitas de Importância Veterinária**. Editora Plêiade/FAPESP, São Paulo, 2001, 218 p.
- HARRUS, S., BARK, H., WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, p. 431-441, 1997.
- HASEGAWA, M. Y. Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular. 2005, 115 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LABARTHE, N., DE CAMPOS PEREIRA, M., BARBARINI, 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, p. 67-75, 2003.
- LABRUNA, M. B. Bioecologia de *Rhipicephalus sanguineus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 123-124, 2004. Supplement.
- LABRUNA, M. B., CAMARGO, L. M. A., TERRASINI, F. A., FERREIRA, F., SCHUMAKER, T. T., CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondonia, western Amazon, Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.
- LEONARD, J.A., WAYNE, R.K., WHEELER, J., VALADEZ, R., GUILLEN, S., VILA, C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**, v. 298, p. 1613-1616, 2002.
- LEWIS, 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*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 1953-1955, 1977.
- LITTLE, S. E., HOSTETLER, J., KOCAN, K. M. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1/2, p. 139-45, 2007.
- KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S.; SOARES, J. F.; LOPES, S.T. Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 415-417, 2012.

- MACHADO, R.Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004. Supplement.
- MATHEW, J. S.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; MURPHY, G. L.; KOCAN, K. M. Attempted transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 11, p. 1594-1599, 1996.
- MORAES-FILHO, J., MARCILI, A., NIERI-BASTOS, F.A., LABRUNA, M.B. Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America: molecular evidence for the presence of two distinct species. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.
- NAVA, S., MASTROPAOLO, M., VENZAL, J. M., MANGOLD, A. J., GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3/4, p. 547-55, 2012.
- OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P.; MATHIAS, M. I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1/2, p. 139-147, 2005.
- PEREZ, M., BODOR, M., ZHANG, C., XIONG, Q., RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 110-117, 2006.
- PEREZ, M., RIKIHISA, Y., WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2133-2139, 1996.
- PINTER, A., LABRUNA, M. B., FACCINI, J. L. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 79-88, 2002.
- POPOV, V. L., HAN, V. C., CHEN, M., DUMLER, J. S., FENG, H. M., ANDREADIS, T. G., TESH, R. B., WALKER, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 2235-2251, 1998.
- POPOV, V.L., KORENBERG, E.I., NEFEDOVA, V. V., HAN, V.C., WEN, J.W., KOVALEVSKII, Y.V., GORELOVA, N.B., WALKER, D.H. Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with *Rickettsia*, *Borrelia*, and a *flavivirus*. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 699-716, 2007.
- RECHAV, Y., ZYZAK, M., FIELDEN, L. J., CHILDS, J. E. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with

- Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 4, p. 414-9, 1999.
- RIBEIRO, V.L. S., WEBER, M. A., FETZER, L. O., VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, p. 285-289, 1997.
- ROMERO, L. E.; MENESES, A. I.; SALAZAR, L.; JIMÉNEZ, M.; ROMERO, J. J.; AGUIAR, D. M.; LABRUNA, M. B.; DOLZ, G. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. **Research Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 95-97, 2011.
- SAITO, T. B., CUNHA-FILHO, N. A., PACHECO, R. C., FERREIRA, F., PAPPEN, F. G., FARIAS, N. A. R., LARSSON, C. E., LABRUNA, M. B. Canine infection by *Rickettsia* and *Ehrlichia* in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 102-108, 2008.
- SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A.; SCHUMAKER, T. T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. *Rickettsial* infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.
- SANTAREM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis***. 2003, 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Botucatu.
- SANTOS, F., COPPEDE, J. S., PEREIRA, A. L., OLIVEIRA, L. P., ROBERTO, P. G., BENEDETTI, R. B., ZUCOLOTO, L. B., LUCAS, F., SOBREIRA, L., MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.
- SZABO, M. P., MANGOLD, A. J., JOAO, C. F., BECHARA, G. H., GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 131-140, 2005.
- TRAPP, S.M., DAGNONE, A.S., VIDOTTO, O., FREIRE, R.L., AMUDE, A. M., DE MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.
- UNVER, A., PEREZ, M., ORELLANA, N., HUANG, H., RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2788-2793, 2001.
- VENZAL, J. M., ESTRADA-PEÑA, A., CASTRO, O., SOUZA, C. G., PORTILHO, A., OTEO, J.A. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. **Parasitología latinoamericana**, v. 62, p. 23-26, 2007.

VIERA, R. F., BIONDO, A. W., GUIMARÃES, A. M., MESSICK, J. B., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

WALKER, A. R., BOUATTOR, A., CAMICAS, J. L., ESTRADA-PEÑA, A., HORAK, I. G., LAFIT, A. A., PEGRAM, R. G., PRESTON, P. M. **Ticks of Domestic Animals in África: A Guide to Identification of Species**. Atalanta, /ICTTD-2/, 2003, 221 p.

WALKER, J. B., KEIRANS, J. E., HORAK, I. G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World**. Cambridge University Press, Cambridge, 2000, 643 p.