DANIEL MOURA DE AGUIAR

Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil

São Paulo

2006

DANIEL MOURA DE AGUIAR

Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2006

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.1678
FMVZ

Aguar, Daniel Moura de

Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil / Daniel Moura de Aguiar. -- São Paulo : D. M. de Aguiar, 2006.
95 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Ehrlichia canis*. 2. Isolamento animal. 3. Epidemiologia (prevalência). 4. *Rhipicephalus sanguineus*. I. Título.

PARECER DE COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "*Ehrlichia canis*: isolamento em cultura de células, caracterização molecular, prevalência de carrapatos infectados e prevalência de anticorpos anti-E. canis em cães de áreas rural e urbana", protocolo nº623/2005 (sem número definido de cães), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "*Ehrlichia canis*: isolation in cell culture, molecular characterization, infected ticks prevalence and anti-E. canis antibodies prevalence in dogs from rural and urban areas", protocol number 623/2005, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 11 de março de 2005

Prof. Dr. José Luiz Bernadino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AGUIAR, Daniel Moura de

Título: Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil

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

Data: __/__/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Em especial aos meus pais *Álvaro* e *Eliane*;
irmãos *Guilherme*, *Ricardo* e *Marcos*; avós
paterno *Alberto* (in memorian) e *Maria* e
materno *Dulsidio* e *Eliete*, por todo amor e
apoio necessário.

A *Cris* pelo apoio e carinho durante toda esta tese.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao amigo professor *Marcelo Bahia Labruna*
pela paciência e ensinamentos desde o
mestrado e por sempre acreditar no
sucesso deste experimento.

À amiga professora *Solange Maria Gennari*,
por todo apoio dado desde o mestrado
(quando me deu a chance de participar do
projeto em Rondônia) e também durante
todo o doutorado.

AGRADECIMENTO

Falar do doutorado, sem lembrar dos anos de residência e mestrado seria uma grande injustiça, pois estas etapas foram importantes para a minha formação, e me ajudaram em muito a superar dificuldades encontradas nesta etapa. Por outro lado, falar disso tudo, sem lembrar dos amigos e das histórias vividas nessas épocas, seria uma injustiça muito maior, porém não haveria páginas suficientes para tudo isso. Mesmo durante o doutorado, que durou no VPS apenas 17 meses, e foram uns dos melhores anos de minha vida. Por esse motivo, em respeito a todos os amigos que participaram da minha vida “pós-graduação”, agradeço em especial àqueles que me ajudaram nesta etapa final:

- As professoras Mitika K. Hagiwara e Rosângela Z. Machado, e as amigas Márcia Hasegawa e Thais Saito pela ajuda no decorrer da tese.
- Aos amigos da parasitária: Adriano, Alessandra, Alexandre Ataliba, Alexandre Thomas, Aline, Eliana, Guacyara, Hilda, Jonas, Lara, Lucia, Luciana, Luciana (Carioca), Marcelo Meirelles, Marcelo (Wilinha), Maria, Mauricio, Micaela, Pedro, Renata, Ricardo, Richard, Silvio, Tatiana, Tiago e Vanessa.
- Aos amigos Adriana, César, Cris Brito, Esther, Fábio, Ivan, Lara, Laura, Leandro, Letticie, Patrícia (Lira), Renata, Renata Paixão, Roberto e Flávia.
- Aos professores Fernando, Leonardo, Paulo, Ricardo, Rodrigo, Silvio e Sônia.
- Aos amigos Alexandre (Finus), Cláudia, Cristina, Danival, Sandra e Virginia.
- A todos os amigos do VPS, entre alunos, professores, funcionários e estagiários, nunca vou me esquecer de vocês.
- A APTA e todos os amigos de lá, pelo apoio nos momentos finais desta tese.
- A FAPESP pelo apoio financeiro (processo: 04/01638-2).

RESUMO

AGUIAR, D. M. de **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. [Epidemiological aspects of canine ehrlichiosis in Brazil]. 2006. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O presente estudo visou obter informações sobre a epidemiologia da erliquiose canina no Brasil, a partir da caracterização molecular de isolados nacionais e de estudo de prevalência da infecção em cães (*Canis familiaris*) e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. Inicialmente, padronizou-se o isolamento de *Ehrlichia canis* em cultivo de células DH82, a partir de um cão inoculado com a cepa Jaboticabal, seguida da identificação do isolado pelo sequenciamento de DNA de um fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia*. Posteriormente, realizou-se o isolamento de *E. canis* de um cão naturalmente infectado, atendido no Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Este novo isolado foi geneticamente caracterizado a partir da PCR almejando fragmentos dos genes *dsb*, 16S rRNA e *P28*. Com o estabelecimento do isolado Jaboticabal em cultivo celular, padronizou-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando-a em amostras de soros de 314 cães de áreas urbana e rural do Município de Monte Negro, RO. Finalmente, avaliou-se pela PCR do gene *dsb*, a frequência de carrapatos infectados e de cães oriundos de quatro populações de *R. sanguineus*, uma do município de Monte Negro, RO. e três do estado de São Paulo. Do cão inoculado com o isolado Jaboticabal, constatou-se o crescimento de *E. canis* em cultivo celular, no 27º dia pós-inoculação, confirmado pela PCR e citologia. Após o seqüenciamento de DNA, o fragmento amplificado a partir do

isolado apresentou-se 100% similar a seqüência correspondente ao gene *dsb* de *E. canis* depositada no GenBank. O isolamento de *E. canis*, a partir do cão atendido no HOVET, foi obtido no 14^o dia pós-inoculação. Esta nova cepa, designada como isolado São Paulo, apresentou-se idêntica às seqüências do gene *dsb* e similares às seqüências dos genes 16S rRNA e *P28*, de outros isolados de *E. canis* disponíveis no GenBank. Dos soros testados pela RIFI, observou-se prevalência (títulos ≥ 40) de 31,2% (98/314), sendo 37,9% (58/153) em cães urbanos e 24,8% (40/161) em cães rurais ($P < 0,05$) de Monte Negro, Estado de Rondônia. A prevalência de carrapatos infectados (dada como freqüência mínima de infecção) foi de 2,3, 6,2, e 3,7% para as populações 1 (Monte Negro), 2 (Jundiaí, SP), e 3 (São Paulo I, SP), respectivamente ($P > 0,05$). Nenhum carrapato infectado foi detectado na população 4 (São Paulo II, SP). Os produtos da PCR dos carrapatos e de cães das populações 1, 2 e 3 foram idênticos entre si e à seqüência de *E. canis* disponível no GenBank. Estes resultados reforçam estudos anteriores, que relataram a infecção por *E. canis* em cães do Brasil, contudo descreve pela primeira vez no Brasil a infecção natural por *E. canis* em carrapatos *R. sanguineus*, tido como o principal carrapatos de cães no país.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, Isolamento animal, Epidemiologia (Prevalência), *Rhipicephalus sanguineus*.

ABSTRACT

AGUIAR, D. M. de **Epidemiological aspects of canine ehrlichiosis in Brazil**. [Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil]. 2006. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The present study was conducted to investigate the canine ehrlichiosis epidemiology in Brazil, through molecular characterization of indigenous isolates and prevalence of infection in dogs (*Canis familiaris*) and *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Firstly, it was performed the isolation of the Jaboticabal strain of *Ehrlichia canis* in DH82 cells from an experimentally infected dog, followed by molecular identification of the isolate by sequencing a fragment of the *Ehrlichia dsb* gene. After that, a new strain of *E. canis* was isolated from a naturally infected dog, assisted in the Veterinarian Hospital (HOVET) of the Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo. This isolate was characterized by obtaining *dsb*, 16S rRNA and *P28* nucleotide partial sequences. After the establishment of Jaboticabal strain in DH82 cells, an Indirect Immunofluorescence Test (IFAT) was developed, and 314 urban and rural dogs from Monte Negro Municipality were tested by this technique. Finally the prevalence of *E. canis* was determined in four different populations of *Rhipicephalus sanguineus* ticks, being one population from Monte Negro, RO. and three from different areas from São Paulo state using a PCR targeting an erlichial *dsb* gene fragment. Culture of *E. canis* Jaboticabal presented positive results by PCR on day 27. The *dsb* sequence was identical to other *E. canis* sequences available in GenBank. Cell culture inoculated with material from the dog assisted in the HOVET became positive by day 14 when *dsb* PCR was positive. This new strain was designated as isolate São Paulo of *E. canis* and showed to contain identical *dsb* and high similar partial sequences of 16S

rRNA and *P28* genes with others *E. canis* strains available in GenBank. Antibodies Anti-*E. canis* (titers ≥ 40) were detected in 31.2% (98/314) of the dogs, being 37.9% (58/153) in urban and 24.8% (40/161) in rural dogs of Monte Negro; these values were significantly different ($P < 0.05$). The prevalence of infected ticks (given as minimal infection rate) was 2.3, 6.2, and 3.7% for populations 1 (Monte Negro), 2 (Jundiaí, SP), and 3 (São Paulo I, SP), respectively, which were statistically similar ($P > 0.05$). In contrast, no infected tick was detected in population 4 (São Paulo II, SP). DNA sequences were determined for some of the PCR products generated from ticks and dogs from populations 1-3, being all identical to each other and to available sequences of *E. canis*. These results reinforce previous studies that reported *E. canis* infecting dogs in Brazil, but report for the first time in Brazil the natural infection of *E. canis* in its vector, *R. sanguineus*, which is the commonest tick infesting dog in this country.

Key-words: *Ehrlichia canis*, Animal Isolation, Epidemiology (Prevalence), *Rhipicephalus sanguineus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
	CAPITULO I.....	23
1	INTRODUÇÃO.....	23
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1	ISOLADO E OBTENÇÃO DO INOCULO DE <i>E. canis</i>	26
2.2	INOCULAÇÃO EM CÉLULAS DH82.....	27
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	27
2.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	28
2.5	SEQUENCIAMENTO.....	29
3	RESULTADOS.....	30
3.1	ISOLAMENTO DE <i>E. canis</i> EM CÉLULAS DH82.....	30
3.2	SEQUENCIAMENTO.....	32
4	DISCUSSÃO.....	33
	CAPITULO II.....	36
1	INTRODUÇÃO.....	36
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1	ORIGEM DO ISOLADO DE <i>E. canis</i>	39
2.2	ISOLAMENTO EM CULTIVO DE CÉLULAS DH82.....	39
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	40
2.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	41
2.4.1	GENE <i>dsb</i>	41
2.4.2	GENE 16S rRNA.....	42

2.4.3	GENE <i>P28</i>	42
2.5	CLONAGEM DOS GENES 16S rRNA e <i>P28</i>	43
2.6	SEQÜENCIAMENTO DOS GENES <i>dsb</i> , 16S rRNA e <i>P28</i>	44
2.7	ACESSO ÀS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS.....	44
3	RESULTADOS	46
3.1	CASO CLÍNICO.....	46
3.2	ISOLAMENTO DE <i>E. canis</i> EM CÉLULAS DH82.....	46
3.3	SEQÜENCIAMENTO.....	48
4	DISCUSSÃO	52
	CAPITULO III	56
1	INTRODUÇÃO	56
2	MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1	LOCAL DO ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	59
2.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLOGICO.....	61
2.3	CONFEÇÃO DAS LÂMINAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	61
2.4	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	62
2.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	62
3	RESULTADOS	63
4	DISCUSSÃO	71

	CAPITULO IV.....	74
1	INTRODUÇÃO.....	74
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1	LOCAL DO ESTUDO.....	77
2.2	AMOSTRAGEM E COLHEITA DE CARRAPATOS.....	77
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA DOS CÃES SUSPEITOS E DOS CARRAPATOS.....	78
2.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	79
2.5	SEQÜENCIAMENTO.....	80
2.6	PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO E ANALISE ESTATISTICA.....	80
3	RESULTADOS.....	81
3.1	COLEÇÃO DE CARRAPATOS.....	81
3.2	PCR E FMI.....	81
3.3	SEQUENCIAMENTO.....	83
4	DISCUSSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a erliquiose tem sido identificada como causa crescente de morbi-mortalidade de caninos e, em alguns países, do homem, em virtude da maior exposição a locais onde é comum a presença de carrapatos. A erliquiose canina é uma doença infecciosa severa, que acomete cães (*Canis familiaris*), causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, sendo a principal espécie a *Ehrlichia canis*. Sua ocorrência vem aumentando significativamente nos últimos anos em todas as regiões do Brasil e está veiculado ao seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como o “carrapato marrom do cão”, que se encontra disseminado por toda área urbana do Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

A erliquiose canina 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 infestação do carrapato vetor, e pela inexistência de vacina.

O reconhecimento da erliquiose, como potencial causa de doença em humanos na década de 80, estimulou as pesquisas desse agente. A detecção de outras espécies próximas, combinada com a aplicação cada vez maior de técnicas de biologia molecular, culminou num maior número de publicações e descobertas, que resultaram na reclassificação das erliquias (COHN, 2003).

Dumler et al. (2001), incorporando informações de biologia molecular referentes aos genes 16S rRNA e *groESL*, reclassificaram a família Anaplasmataceae. Algumas espécies foram transferidas para o gênero *Anaplasma*: *Anaplasma platys* (antiga *E. platys*), *A. phagocytophilum* (junção entre *E. equi* e *E. phagocytophila*), *A. bovis* (antiga *E. bovis*); outras para o gênero *Neorickettsia*:

Neorickettsia risticii (antiga *E. risticii*) e *N. sennetsu* (antiga *E. sennetsu*). Por outro lado, a espécie *Cowdria ruminantium* foi inserida no gênero *Ehrlichia*, passando a ser *E. ruminantium*.

Atualmente o gênero *Ehrlichia* contempla seis espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001). Uma possível sexta espécie foi identificada recentemente por Shibata et al. (2000) no Japão, onde foi isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, sendo designada como *Ehrlichia* OIE. São bactérias gram-negativas, parasitas intracelular obrigatórias de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos, e para algumas espécies, neutrófilos e células endoteliais (DUMLER et al., 2001).

A única espécie descrita até o momento no Brasil é *E. canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC). Seu primeiro relato no país foi feito por Costa et al. (1973) em Belo Horizonte. A doença vem sendo relatada em vários estados, acometendo aproximadamente 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2002).

O ciclo da *E. canis*, começa com a inoculação do agente no cão pelo carrapato *R. sanguineus*, no momento do repasto sanguíneo. A *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; SANTÁREM, 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 e a duração e severidade dos sinais clínicos é variável (HARRUS et al., 1997; SANTARÉM, 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, baço, 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 recentemente estudado do ponto de vista clínico, patológico e imunológico (CASTRO et al., 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). Recentemente, 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.

Poucos estudos têm avaliado a frequência da infecção por *E. canis* em *R. sanguineus*, ainda assim sem resultados relevantes (INOKUMA et al., 2003; SARIH et al., 2005). Outros dois estudos avaliaram carrapatos de diferentes cães e sem número representativo para uma população inteira (MURPHY et al., 1998; UNVER et al., 2001). No Brasil, a presença de *E. canis* em carrapatos ainda não foi realizada.

Ao contrário do que ocorre com a EMC, a prevalência de carrapatos *A. americanum* infectados por *E. chaffeensis* ou *E. ewingii* nos Estados Unidos tem sido verificada em diversos trabalhos, variando entre 0,5 a 10% (BURKET et al., 1998; WHITLOCK et al., 2000; WOLF et al., 2000).

E. canis pode ser cultivada *in vitro* em células DH82 (*dog histiocytosis*), linhagem originária de monócitos caninos, que foi adaptada após um caso de histiocitoma (WELLMAN et al., 1988). Até o momento, são vários os isolados de *E. canis* cultivados e geneticamente caracterizados. Na América do Sul, a Venezuela é o único país onde o mesmo agente foi isolado de cães e humano, sendo também caracterizados geneticamente (UNVER et al., 2001). No Brasil, Torres et al. (2002) na cidade do Rio de Janeiro, isolaram *E. canis* em células DH82 a partir de um cão experimentalmente infectado com um isolado local.

No tocante a caracterização molecular de amostras brasileiras, Machado (2004) e Rosa (2005) verificaram haver similaridade entre amostras Brasileiras de *E. canis* e a de outros países. Estes autores compararam as seqüências parciais dos genes 16S rRNA do isolado Jaboticabal e *dsb* de cepas oriundas da grande São Paulo com as correspondentes de outros isolados mundiais disponíveis no GenBank.

A propagação de *E. canis* em cultura celular tem sido a base para produção de antígenos a serem aplicados em testes sorológicos (PADOCK; CHILDS, 2003).

Atualmente a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o teste mais utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*E. canis*. Entretanto, não há consenso no ponto de corte utilizado na reação sorológica. Segundo Harrus et al. (1997) soros reagentes na diluição 1:40 são considerados positivos e o aumento significativo no título de anticorpos indica infecção ativa, sendo recomendados testes sorológicos pareados para confirmar a suspeita clínica.

McBride et al. (2001), avaliando por “*Western blotting*” a reatividade de diferentes proteínas de membrana (P28 e P43) de *E. canis*, verificaram boa correlação com a RIFI (≥ 40). A proteína P43 apresentou 100% de sensibilidade e 85% de especificidade quando comparada à RIFI, enquanto a P28 apresentou sensibilidade de 96% e especificidade de 100%. Entretanto, a RIFI empregada em alguns inquéritos epidemiológicos utilizaram diluições iniciais de 1:20, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 - Ocorrência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães oriundos de diversas partes do mundo. São Paulo - 2006

Local	Ano	Cães		%	Titulo	Referência
		testados	Positivos			
E.U.A.	1986/87	259	138	53	1:10	Rodger et al. (1989)
Zimbábue	1992	105	37	52	1:20	Mathewman et al. (1993)
Espanha	1993/94	308	59	19	1:20	Sáinz et al. (1996)
Israel	1996	410	123	30	1:20	Baneth et al. (1996)
Suíça	1991/98	996	22	02	1:20	Pusterla et al. (1998)
Austrália	1996/99	316	07	02	1:20	Mason et al. (2001)
Costa do Marfim	2003	137	93	68	1:80	Davoust et al. (2005)
Gabão	2003	253	08	03	1:80	Davoust et al. (2005)
Camarões	2005	104	33	32	1:64	Ndip et al. (2005)

Estudos epidemiológicos sobre a infecção de cães por *E. canis* no Brasil, vêm sendo realizados envolvendo a clínica da doença, a idade, sexo e raça dos cães ou mesmo a presença de carrapatos, na tentativa de se estabelecer fatores de riscos para a infecção (DAGNONE et al., 2003; SANTARÉM, 2003; TRAPP et al., 2002). Entretanto, se não ausentes, são raros os estudos avaliando a prevalência da infecção por *E. canis* em cães e carrapatos no Brasil.

Dada a indiscutível relevância da EMC na clínica veterinária, o presente estudo foi elaborado com vistas a obter informações sobre a epidemiologia da doença no Brasil, caracterizando isolados nacionais, e conhecendo os índices de infecção em cães e carrapatos.

Em especial foram avaliados:

- I. Isolamento de *E. canis* em células DH82, a partir de cão experimentalmente infectado com o isolado Jaboticabal;
- II. Isolamento e caracterização molecular de um novo isolado local, a partir de cão naturalmente infectado atendido no Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP);
- III. Padronização da RIFI a partir do isolado Jaboticabal para determinar a prevalência de anticorpos anti-*E. canis* em cães das zonas urbana e rural do município de Monte Negro, RO;
- IV. Determinar pela PCR da frequência de infecção por *E. canis* em diferentes populações de carrapatos *R. sanguineus*.

CAPITULO I

PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Ehrlichia canis* (RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE).

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Ehrlichia*, atualmente compreende cinco espécies: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al. 2001). Uma possível sexta espécie foi identificada recentemente de carrapatos *Ixodes ovatus* no Japão, sendo designada como *Ehrlichia* OIE (SHIBATA et al., 2000). São bactérias gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, como monócitos e macrófagos e para algumas espécies, em neutrófilos e células endoteliais (DUMLER et al., 2001).

No Brasil, a única espécie descrita até o momento é *E. canis*, responsável pela erliquiose monocítica canina (EMC), doença considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas, onde abundam populações do carrapato vetor, *Rhipicephalus sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Em Belo Horizonte, foi por Costa et al. (1973) que a doença foi primeiramente diagnosticada no Brasil. Desde então vem sendo relatada acometendo aproximadamente 20 a 30% dos cães (*Canis familiaris*) atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de estados das regiões nordeste, sudeste, sul e centro-oeste (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2002).

A *E. canis* pode ser cultivada *in vitro* em células DH82 (*dog histiocytosis*), linhagem originária de monócitos caninos, que foi adaptada em cultivo celular a partir de células obtidas de um caso de histiocitoma (WELLMAN et al., 1988). Até o momento, são vários os isolados de *E. canis* cultivados *in vitro* e geneticamente caracterizados na América do Norte e no Velho Mundo. No caso da América Latina, o isolamento *in vitro* de *E. canis* de cães, foi relatado apenas na Venezuela (UNVER et al., 2001) e no Brasil por Torres et al. (2002) no Rio de Janeiro. Na Venezuela, há pelo menos seis casos clínicos descritos de erliquiose humana causada por *E. canis*, indicando que este agente pode causar infecções no homem (PEREZ et al., 2005).

A propagação de *E. canis* em cultura celular tem sido a base para produção de antígenos a serem aplicados em testes sorológicos (PADOCK; CHILDS, 2003). A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o teste mais utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*E. canis*. Por outro lado, o diagnóstico direto da erliquiose canina, por meio de exames citológicos do sangue, vem sendo frequentemente utilizado na clínica veterinária. Todavia, esta técnica resulta freqüentemente em resultados falsos negativos (HARRUS et al., 1997). Para tentar minimizar esta desvantagem, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada e vem se mostrando sensível e específica para o diagnóstico da erliquiose canina. La Scola e Raoult (1997), relataram que a PCR é técnica de eleição para o diagnóstico da erliquiose canina, pois pode detectar o agente mesmo antes da formação de mórulas ou de soroconversão.

A recente caracterização molecular do gênero *Ehrlichia* tem identificado novos genes como alvos para ensaios moleculares. O gene Thio-dissulfóxido-oxiredutase foi caracterizado em várias bactérias, sendo recentemente identificada no gênero *Ehrlichia* (MCBRIDE et al., 2002). Este gene codifica proteínas

responsáveis pelas ligações dissulfídicas (disulfide bond - *dsb*) das bactérias. Apesar disso, é muito divergente entre as bactérias, sendo útil para ensaios moleculares de alta especificidade (KUYLER DOYLE et al., 2005a). A PCR do gene *dsb* de *Ehrlichia* mostrou-se altamente específico, já que é altamente divergente dos outros gêneros de bactérias, mesmo daquelas filogeneticamente mais próximas (KUYLER DOYLE et al., 2005a).

Visando a obtenção de novos isolados nacionais, este trabalho relata a padronização de um método de isolamento de *E. canis* em cultivo de células DH82, a partir do isolado Jaboticabal e da utilização da PCR do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp na identificação e caracterização do agente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento, foi inoculado um cão com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, para tentativa de isolamento em cultura celular, como segue adiante.

2.1 ORIGEM DO ISOLADO E OBTENÇÃO DO INOCULO DE *E. canis*

Uma cepa de *E. canis* foi isolada de um cão fêmea da raça Weimaraner, em fase aguda da doença (informação verbal¹), na cidade de Jaboticabal-SP, sendo mantida até o presente por passagens em cães, através da inoculação de sangue infectado e de amostras de sangue infectado congelado. Esta cepa foi designada como isolado Jaboticabal.

Para o presente estudo, uma cadela saudável, sem raça definida, de aproximadamente três anos, vermifugada, vacinada contra as principais doenças caninas e com exame de PCR (gene *dsb*, protocolo descrito abaixo) negativo para erliquiose, foi inoculada com 5 ml de sangue canino infectado com a cepa Jaboticabal de *E. canis*. Após a inoculação, a cadela foi acompanhada diariamente, até o aparecimento dos sinais clínicos da erliquiose (anorexia, apatia, linfadenopatia e febre), quando foram realizados exame hematológico e PCR. Paralelamente, foram realizados esfregaços de sangue periférico, corados pelo Kit Panótico Rápido (Laborclin[®]), para visualização de estruturas compatíveis com *E. canis* (mórulas). Quando positivo na PCR, foram amostrados 10 ml de sangue heparinizado para fins de isolamento.

¹ Informação fornecida por Machado, R. Z. (FCAV-UNESP Campus de Jaboticabal) em 2004.

2.2 INOCULAÇÃO EM CÉLULAS DH82.

A amostra de sangue positiva na PCR foi processada para o isolamento de leucócitos, utilizando o protocolo descrito por Paddock et al. (1997), baseado no uso de Histopaque 1083 (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo). Os leucócitos foram então inoculados em monocamadas de células DH82, repicadas três dias antes e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Para o crescimento e manutenção celular foi utilizado o meio Dulbecco's, Modified Eagle's (Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro de bezerro (Bovine Calf Serum – BCS; Hyclone®), renovado parcialmente a cada 3-4 dias.

A monocamada inoculada foi acompanhada após a segunda semana, à cada 5-6 dias por exames citológicos, corados com o Kit Panótico rápido (Laborclin®) e pela PCR do gene *dsb* para confirmação da infecção. Quando a monocamada desta primeira passagem apresentou no mínimo de 50% de infecção, alíquotas de seu sobrenadante foram inoculadas em novas monocamadas não infectadas, a fim de estabelecer novas passagens. Este procedimento foi realizado em passagens subseqüentes, até que a monocamada apresentasse 90 a 100% de infecção dentro de poucos dias após a inoculação, implicando no estabelecimento do isolado em cultivo celular.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA do sangue do cão inoculado e da monocamada infectada foi realizada com kit de extração “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, Ca) conforme manual de instrução.

2.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Foi utilizada uma PCR contendo: 100-400 ng de DNA; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 0,4 µM de cada iniciador (*primer*) *dsb*: Dsb-330 (senso: 5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e Dsb-729 (anti-senso; 5'-CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3'); 1,25 U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA polymerase - Invitrogen); solução tampão (pH 8,4) contendo 50 mM de KCL; 20 mM Tris-HCL e 3 mM de MgCl₂. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada para completar 50µl e a amplificação foi efetuada em termociclador automático (Eppendorf®). Em cada série, foram incluídos controles positivo (DNA de *E.chaffeensis*) e negativo (água).

Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos, seguida de uma sequência de 50 ciclos repetidos de 15 segundos a 95°C (desnaturação das fitas de DNA), 30 segundos a 58°C (pareamento dos “*primers*”) e 30 segundos a 72°C (extensão da cadeia), seguidos de cinco minutos de extensão final a 72 °C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5-2% em ácido-EDTA tris-bórico tamponado, revelados com brometo de etídio em transiluminação ultravioleta. Compararam-se os fragmentos amplificados, com marcadores de DNA de 100 pares de base (pb; Fermentas Life Science®, Burlington, On), considerando como positivas amostras cujos produtos apresentaram tamanho aproximado de 409 pb.

2.5 SEQÜENCIAMENTO

Os produtos amplificados foram seqüenciados para confirmar a identidade da espécie de *Ehrlichia*. As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados foram analisadas em seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções. As seqüências obtidas foram alinhadas com outra seqüência correspondente de *E. canis*, disponível no GenBank, utilizando-se o programa MegAlign do pacote DNASTar (Lasergene). O número de acesso da seqüência de *dsb* obtida no GenBank usada para comparação é AF403710, correspondente ao isolado Jake de *E. canis*.

3 RESULTADOS

Os resultados foram descritos por etapa para uma melhor compreensão.

3.1 ISOLAMENTO DE *E. canis* EM CÉLULAS DH82

Após a inoculação da cadela com o isolado Jaboticabal de *E. canis*, a doença foi manifestada com alterações clínicas (apatia, febre e linfadenopatia) a partir de 14 dias. O exame hematológico apresentou: hemácias: $6,1 \times 10^6/\text{mm}^3$; hematócrito: 40%; contagem total de leucócitos: $3.000/\text{mm}^3$; plaquetas $47.000/\text{mm}^3$. Neste momento, verificou-se o aparecimento de mórulas em monócitos sanguíneos (Figura 1) quando houve também a confirmação pela PCR.

Figura 1 – Fotomicrografia de monócito canino infectado por *Ehrlichia canis* sob a forma de mórula (seta) aos 14 dias pós-inoculação. Panótico rápido (Laborclin[®]); 100X

No 15º dia pós-inoculação, durante o pico febril de 41°C, foram amostrados 10 ml de sangue heparinizado, que foi processado para ser inoculado numa monocamada de células DH82 não infectada. No 27º dia pós-inoculação, obteve-se o primeiro resultado positivo na PCR (Figura 2), confirmando o isolamento com a visualização de mórulas no exame citológico aos 28 dias (Figura 3). No 33º dia pós-inoculação, observou-se 20% de células infectadas e aos 53 dias, 60% de infecção.

Figura 2 - Amplificação de um fragmento do gene *dsb* de *Ehrlichia* sp, correspondente a 409 pares de bases (pb), em gel de eletroforese corado com brometo de etídio. Linha 1: sangue do cão doador antes de receber o inoculo de *E. canis*; Linha 2: sangue do cão aos 14 dias pós-inoculação. Linha 3: monocamada de células DH82 infectadas com *E. canis* no 27º dia pós-inoculação. Linhas 4 e 5: controles negativos; Linha 6: marcador de peso molecular (100 pb)

A partir da segunda passagem, amostras de células infectadas foram criopreservadas a -80°C , em soro de bezerro com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Atualmente, o isolado encontra-se estabelecido em células DH82, com várias passagens atingindo 90-100% de infecção dentro de 7-10 dias após a inoculação.

Figura 3 - Fotomicrografias de células DH82 provenientes de monocamada inoculada com o isolado de Jaboticabal, SP apresentando mórulas de *Ehrlichia canis* (setas) aos 28 dias pós-inoculação. Panótico rápido (Laborclin[®]); 100X

3.2 SEQUENCIAMENTO

Após exclusão das porções correspondentes aos primers dos produtos amplificados do sangue do cão inoculado e do cultivo celular (primeira e quarta passagens), obteve-se um fragmento de 355 nucleotídeos de cada produto da PCR. As seqüências foram idênticas entre si, e quando comparadas com as seqüências disponíveis no GenBank, apresentaram 100% de similaridade com a seqüência de *E. canis* AF403710. O código de acesso da seqüência de nucleotídeos do gene *dsb* do isolado Jaboticabal no GenBank é DQ460716.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho relata o cultivo *in vitro* de *E. canis* em células DH82, proveniente de cão experimentalmente infectado com a amostra Jaboticabal. Em estudo prévio, Torres et al. (2002) também obtiveram êxito no isolamento de uma amostra de *E. canis* na cidade do Rio de Janeiro, utilizando protocolo semelhante, separando a fração leucocitária com auxílio de Histopaque 1077 (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo).

Durante a infecção experimental por *E. canis* no presente trabalho, a observação do início dos sintomas clínicos da erliquiose teve início aos 14 dias pós-inoculação. Este resultado encontra-se dentro do esperado, conforme relatado por Castro et al. (2004) e Machado (2004) e confirmado por Hasegawa, (2005). O resultado de hemograma, feito no momento em que o cão apresentou sinais clínicos, foi compatível ao relatado na literatura (HARRUS et al., 1997; MACHADO, 2004), a exceção das hemácias que se mantiveram acima dos valores relatados por Castro et al. (2004). Vale ressaltar que este isolado foi recentemente estudado do ponto de vista clínico, patológico e imunológico (CASTRO et al., 2004; HASEGAWA, 2005).

O cultivo *in vitro* de *E. canis* vem sendo realizado em diversas partes do mundo (KEYSARY et al., 1996; TORRES et al., 2002; UNVER et al., 2001), em células de linhagem originária de histiocitoma canino – DH82. Outras linhagens celulares têm se mostrado útil para o isolamento *in vitro* de *E. canis*, como macrófago peritoneal canino (STEPHENSON; OSTERMAN, 1977), monócito primário canino (HEMELT et al., 1980), célula endotelial humana (DAWSON et al., 1993) e células macrofágicas de camundongos BALB/C (KEYSARY et al., 2001). Os

isolamentos foram importantes para obtenção de diferentes isolados, o que possibilitou a comparação de várias estirpes de *E. canis* (UNVER et al., 2001).

O isolamento em cultivo celular se mostrou positivo no 27º dia pós-inoculação pela PCR. Aos 28 dias, foi observada a presença de mórulas no citoplasma celular. Aguirre et al. (2004) e Dawson et al. (1991) apresentaram resultados semelhantes a este estudo, com a visualização de mórulas aos 30 e 24 dias pós-inoculação. Com base nas observações de Iqbal e Rikihisa (1994), o tempo requerido para a cultura se tornar positiva, está diretamente relacionada com o número de monócitos infectados no inóculo. Torres et al. (2002) realizaram o cultivo primário de leucócitos caninos, antes de inocular em células DH82, e com isso observou positividade aos 14º dia pós-inoculação.

No acompanhamento da cultura da primeira passagem foi observado no 33º dia pós-inoculação 20% de células infectadas e aos 53 dias, 60% de infecção. Torres et al. (2002) observaram 30% de infecção no 28º dia e 60% no 42º dia pós-inoculação. Estas diferenças ocorrem em virtude de diversos fatores, como o tamanho do inóculo, diferenças entre meio de cultura, uso de antibióticos e o método utilizado para a observação das mórulas (IQBAL; RIKIHISA, 1994).

A amplificação de porções do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp mostrou-se útil para a detecção molecular do agente. Kuyler Doyle et al. (2005a), durante a padronização desta PCR, demonstraram que a amplificação do gene *dsb* apresentou sensibilidade e especificidade similares a amplificação do gene 16S rRNA, quando utilizadas em amostras clínicas. Além do mais, a PCR do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp, apresentou sensibilidade para uma única cópia deste gene em *E. cheffeensis* e 10 cópias em *E. canis* (informação verbal²). O gene *dsb*, recentemente foi alvo de novos estudos

² Informação fornecida por Labruna, M. B. (FMVZ- USP, campus de São Paulo) em 2004.

epidemiológicos e filogenéticos no Brasil (ROSA, 2005) e em Camarões (NDIP et al., 2005).

O seqüenciamento de um fragmento do gene *dsb* do isolado Jaboticabal, quando comparado com as seqüências disponíveis no GenBank, apresentou-se idêntico a um isolado norte americano (GenBank: AF403710). Recentemente, Rosa (2005) e Ndip et al. (2005), também apresentaram resultados semelhantes aos deste estudo. O gene *dsb* é altamente variado (variando entre 69,5 – 91,5%) entre as espécies, porém as seqüências de *E. canis* disponíveis no GenBank são todas idênticas. Recentemente, o isolado Jaboticabal teve seu fragmento de 398 pb do gene 16S rRNA, seqüenciado, demonstrando também identidade com a seqüência correspondente de 16S rRNA de *E. canis* depositada no GenBank (MACHADO, 2004), o que reforça a possibilidade dos isolados do continente americano apresentarem pouco polimorfismo.

O presente isolado de *E. canis* encontra-se depositado na Coleção de Erliquias e Riquetsias do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Destaca-se neste trabalho, a manutenção contínua do isolado Jaboticabal de *E. canis* em células DH82. Conseqüentemente, sua manutenção será utilizada na produção de antígenos para o diagnóstico complementar da erliquiose canina brasileira.

CAPITULO II

ISOLAMENTO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO ISOLADO DE *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae).

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a erliquiose tem sido identificada como causa crescente de morbi-mortalidade de caninos e, em alguns países, do homem, em virtude da maior exposição a locais onde é comum a presença de carrapatos. A erliquiose canina é uma doença infecciosa severa, que acomete cães (*Canis familiaris*), causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*. Este gênero comporta as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001). Uma possível sexta espécie foi isolada de carrapatos *Ixodes ovatus* no Japão, e foi designada como *Ehrlichia* OIE (SHIBATA et al., 2000).

A erliquiose canina caracteriza-se por uma doença multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia na intensidade, de acordo com a fase clínica da doença (COHN, 2003). Esta ampla variação do quadro clínico, aliado ao longo período de portador e a natureza nidícola do *Rhipicephalus sanguineus*, contribuíram para a disseminação da *E. canis*, tornando-a uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas nos países tropicais (HASEGAWA, 2005).

No Brasil, a doença é considerada enzoótica. Segundo dados de estimativas recentes, obtidas por Trapp et al. (2002), Dagnone et al. (2003), Labarthe et al. (2003) e Bulla et al. (2004), a erliquiose canina vem acometendo

aproximadamente 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de vários estados do Brasil.

A *E. canis* é cultivada *in vitro* em células DH82 (*dog histiocytosis*), linhagem originária de monócitos caninos, que foi adaptada em cultivo celular a partir de células obtidas de um caso de histiocitoma (WELLMAN et al., 1988). Até o momento, são vários os isolados de *E. canis* cultivados *in vitro* e geneticamente caracterizados (MCBRIDE et al., 1999; UNVER et al., 2001). A Venezuela é o único país onde *E. canis* foi identificada simultaneamente em cães, humanos e carrapatos *R. sanguineus*, confirmando o papel zoonótico de *E. canis* (PEREZ et al., 2005; UNVER et al., 2001).

No tocante à identificação taxonômica da *E. canis*, técnicas moleculares de seqüenciamento têm sido freqüentemente empregadas, já que este método possibilita também uma análise comparativa entre os diversos isolados de *E. canis* encontrados na literatura, através de um banco genético disponível mundialmente - Genbank (UNVER et al., 2001; ZHANG et al., 2003).

O gene 16S rRNA tem sido utilizado freqüentemente para detecção e caracterização de *Ehrlichia* spp em carrapatos e amostras clínicas de humanos e animais (PADDOCK; CHILDS, 2003). Entretanto, como o gene 16S rRNA é altamente conservado em todas as espécies de bactérias, os diferentes isolados mundiais de *E. canis* obtidos *in vitro*, quando avaliados geneticamente, apresentaram pouco polimorfismo genético (AGUIRRE et al., 2004). No Brasil, a amostra de *E. canis* da cidade de Jaboticabal, SP, foi seqüenciada segundo um fragmento de 398 pares de bases (pb) do gene 16SrRNA, demonstrando identidade com as seqüências de *E. canis* disponíveis no GenBank (MACHADO, 2004).

McBride et al. (1999), comparando o gene *p28* de sete isolados de *E. canis* dos EUA, observaram completa conservação deste gene, sugerindo a inexistência de variação antigênica entre os isolados norte-americanos. A proteína *p28* é considerada forte candidata a ser base para uma futura vacina para a prevenção da erliquiose canina.

O gene Thio-dissulfóxido-oxiredutase (*dsb*) foi caracterizado em várias bactérias, sendo recentemente identificado no gênero *Ehrlichia*. Este gene codifica proteínas responsáveis pelas ligações dissulfídicas (disulfide bond - *pdsb*) e por isso possui domínios protéicos que são funcionalmente conservados entre diferentes bactérias (MCBRIDE et al., 2002). Entretanto, a sequência de nucleotídeos, que codifica esta proteína, diverge significativamente entre os diferentes gêneros bacterianos. Por esse motivo, o gene *dsb* é um excelente alvo para ensaios moleculares de alta especificidade (KUYLER DOYLE et al., 2005a).

Decorrente da escassez de estudos filogenéticos sobre *E. canis* no Brasil, este trabalho visou relatar um novo isolamento *in vitro* de *E. canis* em células DH82, a partir de um cão naturalmente infectado, seguido da caracterização molecular dos genes *dsb*, 16S rRNA e *P28*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento, foi utilizado um cão atendido no Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) com suspeita clínica de erliquiose canina.

2.1 ORIGEM DO ISOLADO DE *E. canis*

Um cão macho, da raça Labrador, de sete anos, foi atendido pela Clínica Médica do HOVET (FMVZ/USP), apresentando apatia, anorexia, hematoquesia e histórico recente de infestação pelo carrapato *R. sanguineus*. O animal tinha sido recentemente tratado para erliquiose canina com Doxiciclina (10 mg/Kg, bid/21 dias) e duas aplicações de Imidorcarb (5mg/Kg) a intervalos de 14 dias. Porém, apresentou recidiva clínica 21 dias após o termino do tratamento. No momento do atendimento, foram obtidas amostras de sangue para exame hematológico, pesquisa do agente pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp e para tentativa de isolamento em cultivo celular.

2.2 ISOLAMENTO EM CULTIVO DE CÉLULAS DH82

A amostra de sangue destinada ao isolamento foi processada utilizando o protocolo descrito por Paddock et al. (1997), baseado no uso de Histopaque 1083 (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo). Os leucócitos foram no primeiro momento, ressuspendido em 5 ml de meio Dulbecco's, Modified Eagle's (Sigma Aldrich®) acrescido de 10% de soro de bezerro (Bovine Calf Serum – BCS; Hyclone®) em

frasco de 25 cm² (aqui designado como cultivo primário de leucócito canino). Após 24 horas, adicionou-se mais 2 ml do meio de cultura. Paralelamente, vinha sendo mantido um frasco de monocamada de células DH82 não infectada, com meio Dulbecco's Modified Eagle's acrescido de 5% de soro de bezerro. Após 36 horas, 3 ml do sobrenadante do cultivo primário de leucócito canino foi descartado, sendo repostado com 3 ml de solução de repique (1:2) da monocamada não infectada. Este frasco foi mantido em meio Dulbecco's, Modified Eagle's acrescido de 5% de soro de bezerro, renovado parcialmente a cada 3-4 dias.

A monocamada inoculada foi acompanhada após a segunda semana, à cada 5-6 dias por exames citológicos, corados com o Kit Panótico rápido (Laborclin[®]) e pela PCR do gene *dsb* para confirmação da infecção. Quando a monocamada desta primeira passagem apresentou 50% de infecção, alíquotas de seu sobrenadante foram inoculadas em novas monocamadas não infectadas, a fim de estabelecer passagens do isolado. Este procedimento foi realizado em passagens subseqüentes, até que a monocamada apresentasse 90 a 100% de infecção dentro de poucos dias após a inoculação, implicando no estabelecimento do isolado em cultivo celular.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA, procedentes do sangue do cão atendido no HOVET e das monocamadas infectadas foram realizadas com kit de extração "QIAamp Blood Kit" (Qiagen, Chatsworth, Ca) conforme manual de instrução.

2.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Inicialmente, foi realizada a amplificação do gene *dsb* de *Ehrlichia* spp (KUYLER DOYLE et al., 2005a) nas amostras de sangue e na monocamada de células DH82 infectadas para confirmação da infecção. Após a confirmação do isolamento, foram realizadas mais duas PCRs a fim de avaliar a sequência de nucleotídeos dos genes 16S rRNA (ANDERSON et al., 1992; BREITSCHWERDT et al., 1998; ROSA, 2005) e *P28* (MCBRIDE et al., 1999).

2.4.1 GENE *dsb*

Para a amplificação do gene *dsb* de *Ehrlichia*, utilizou-se uma PCR contendo: 100-400 ng de DNA; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 0,4 µM de cada iniciador (primer) *dsb*: Dsb-330 (senso: 5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e Dsb-729 (anti-senso; 5'-CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3'); 1,25 U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA polymerase - Invitrogen); solução tampão (pH 8,4) contendo 50 mM de KCL; 20 mM Tris-HCL e 3 mM de MgCl₂. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada para completar 50µl e a amplificação foi efetuada em termociclador automático (Eppendorf®). Foram incluídos um controle positivo (DNA de *E.canis*, cepa Jaboticabal) e um controle negativo (água).

Inicialmente as amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos, seguida de uma sequência de 50 ciclos repetidos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, seguidos de cinco minutos de extensão final a 72°C.

2.4.2 GENE 16S rRNA

O gene 16S rRNA, foi amplificado numa PCR contendo: 100-400 ng de DNA; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 0,4 µM de cada iniciador (primer) GE2'F2' (senso: 5'-GTT AGT GGC ATA CGG GTG AGT-3') (BREITSCHWERDT et al., 1998) e HE3 (anti-senso; 5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT-3') (ANDERSON et al., 1992); 1,25 U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA polymerase - Invitrogen); solução tampão (pH 8,4) contendo 50 mM de KCL; 20 mM Tris-HCL e 3 mM de MgCl₂. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada para completar 50µl e a amplificação foi efetuada em termociclador automático (Eppendorf®). A amplificação envolveu dois ciclos, que foram programados juntos. Inicialmente as amostras foram desnaturadas a 94°C por cinco minutos, seguida de uma seqüência de 20 ciclos repetidos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C. Em seguida dá-se inicio ao segundo ciclo, com uma seqüência de 40 ciclos repetidos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 30 segundos a 72°C, seguido de cinco minutos de extensão final a 72 °C. Foram incluídos um controle positivo (DNA de *E. canis*, cepa Jaboticabal) e um controle negativo (água).

2.4.3 GENE *P28*

Para amplificar fragmentos do gene *P28*, foi utilizada uma PCR contendo: 100-400 ng de DNA; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega®); 0,4 µM de cada iniciador (primer), 793' (senso: 5'-GCA GGA GCT GTT GGT TAC TC-3') e 1330 (anti-senso; 5'-CCT TCC TCC AAG TTC TAT GCC-3'); 1,25

U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA polymerase - Invitrogen); solução tampão (pH 8,4) contendo 50 mM de KCL; 20 mM Tris-HCL e 3 mM de MgCl₂. O volume foi completado com água MilliQ autoclavada para completar 50µl e a amplificação foi efetuada em termociclador automático (Eppendorf®). Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos, seguidos de uma seqüência de 30 ciclos repetidos de 30 segundos a 95°C, um minuto a 60°C e dois minutos a 72°C, seguidos de cinco minutos de extensão final a 72 °C. Foram incluídos um controle positivo (DNA de *E.canis*, cepa Jaboticabal) e um controle negativo (água).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5-2% em ácido-EDTA Tris-bórico tamponado, revelados com brometo de etídio em transiluminação ultravioleta. Compararam-se os fragmentos amplificados com marcadores de DNA de 100 pares de base (pb; Fermentas Life Science®), considerando como positivas, as amostras cujos produtos apresentaram tamanho aproximado de 409 pb para o gene *dsb*, 360 pb para o gene 16SrRNA e 518 pb para o gene *P28*.

2.5 CLONAGEM DOS GENES 16S rRNA e *P28*

Os produtos amplificados dos genes 16S rRNA e *P28*, foram purificados do gel de agarose com auxilio do Kit de purificação “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Chatsworth, Ca) segundo manual de instruções. Os produtos, depois de purificados, foram clonados em *Escherichia coli* através do vetor “PCR 2.1-TOPO” com Kit de clonagem “PCR TOPO TA cloning vector” (Invitrogen, Santa Clarita, Ca) segundo manual de instruções.

2.6 SEQÜENCIAMENTO DOS GENES *dsb*, 16S rRNA e *P28*.

As seqüências de nucleotídeos obtidas do gene *dsb*, e dos produtos clonados (mínimo de 3 clones para cada gene) dos genes 16S rRNA e *P28*, foram analisadas em seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções. Para isso, foram utilizados os primers senso e anti-senso de cada gene pesquisado. As seqüências obtidas foram alinhadas com outra seqüência correspondente de *E. canis*, disponível no GenBank, utilizando-se o programa MegAlign do pacote DNASTar (Lasergene).

2.7 ACESSO ÀS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Os números de acessos das seqüências de *dsb* obtidas no GenBank, usadas para as comparações foram: AF403710, DQ460716 e DQ124254, correspondentes aos isolados Jake e Jaboticabal e a cepa camaronesa de *E. canis*. As espécies *E. chaffeensis* (CP000236 e AF403711), *E. ewingii* (AY428950), *E. muris* (AY236484), IOE (AY23485) e *E. ruminantium* (AF308669) também foram comparadas à seqüência do gene *dsb*.

Para comparar a seqüência de nucleotídeos do gene 16S rRNA, utilizou-se as seqüências correspondentes aos isolados Israeli (U26740), Madrid (AY394465), Jake (AF403711), Oklahoma (M73221), Flórida (M73226), VDE (AF373613), VHE (AF373612) e Jaboticabal (DQ460716) e às cepas TW17209 da Tailândia (DQ228512), Germishuys (U54805) da África do Sul e Kagoshima do Japão (AF536827). Também foram comparadas, as seqüências dos isolados Arkansas

(AF416764) e Jax de *E. chaffeensis* (ECU86664), *E. ewingii* (AY093439), *E. muris* (U15527), *E. ruminatium* (CR925678) e IOE (AB28319).

O produto amplificado do gene *P28* foi comparado às seqüências dos isolados norte-americanos Jake (AF082744) e Oklahoma (AF078553) e a seqüências dos isolados Jax (AF479840) e Arkansas (AF479833) de *E. chaffeensis*, *E. ewingii* (AF287961), *E. muris* (AB78804), IOE (AB178802) e *E. ruminantium* (AF368012).

A seqüência de aminoácidos da proteína *dsb* (*pdsb*) foi comparada ao isolado de *E. canis* Jake (AAZ68742) e às espécies *E. chaffeensis* (YP_507114), *E. muris* (AAO92065), IOE (AAO92066), *E. ruminantium* (ALLO8831) e *E. ewingii* (AAR29080). A seqüência de aminoácidos da proteína de membrana p28 foi comparada aos isolados Oklahoma (AAK28699) e Jake (AAZ68946) de *E. canis* e à *E. chaffeensis* (AAL12921), *E. muris* (BAD66856), *E. ewingii* (AAG44897) *E. ruminantium* (ABC87920) e IOE (BAD66850).

3 RESULTADOS

Os resultados foram descritos por etapa para uma melhor compreensão.

3.1 CASO CLÍNICO

No momento do atendimento, o cão não apresentava alterações clínicas. A temperatura retal era normal (38,5°C). O exame hematológico apresentou: hemácias: $4,7 \times 10^6 / \text{mm}^3$; (5–8*) hematócrito: 33% (37–54); hemoglobina: 10,8 g/dL (12–18); leucócitos: $4.700 \text{ cel}/\text{mm}^3$ (6-17); neutrófilos: $2.444 \text{ cel}/\text{mm}^3$ (3.000–11.500); linfócitos: $1.598 \text{ cel}/\text{mm}^3$ (1.500–5.000); monócitos: $658 \text{ cel}/\text{mm}^3$ (0–800) e plaquetas $19.000/\text{mm}^3$ (200–500.000). O exame da PCR do sangue apresentou-se positivo, amplificando um produto de 409 pb.

3.2 ISOLAMENTO DE *E. canis* EM CÉLULAS DH82

Aos 14 dias pós-inoculação, a monocamada de células DH82 apresentou-se positiva à PCR do gene *dsb*, e as primeiras estruturas foram visualizadas aos 21 dias. Nesta ocasião, constatou-se a presença de pequeno número de mórulas compatíveis com *Ehrlichia* spp (Figura 1). Aos 28 dias, a monocamada permaneceu com a taxa de infecção inalterada (entre 5 e 10%), apresentando resultados positivos na PCR (Figura 2). O crescimento da taxa de infecção foi lento, apenas após três meses a monocamada apresentou 90 a 100% de infecção. Porém, após a

* Parâmetros normais segundo JAIN, 2000.

adaptação em cultivo celular, este isolado passou a atingir 90-100% de infecção dentro sete dias após a inoculação.

Figura 1 - Fotomicrografia de células DH82 aos 21 dias pós-inoculação apresentando mórulas de *Ehrlichia canis* (setas). Panótico rápido (Laborclin®); 100X

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos amplificados do gene *dsb* das monocamadas de células DH82 inoculadas com sangue de cão com erliquiose proveniente do HOVET/USP. Linha 1: PCR aos 14 dias pós-infecção (dpi); linha 4: PCR aos 28 d.p.i.; linha 7: controle positivo; linhas 02, 03, 05 e 06: controle negativo; 8: Ladder de 100 pares de bases (pb)

3.3 SEQÜENCIAMENTO

O presente isolado apresentou-se positivo na PCR dos genes 16S rRNA e *P28* conforme o esperado (Figura 3). Os fragmentos amplificados destes genes foram clonados, o que permitiu obter fragmentos melhores para a análise de seqüenciamento.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos amplificados do gene *P28* (linhas 2 e 4; 518 pb) e 16S rRNA (linhas 10 e 12; 360 pb) do isolado de *Ehrlichia canis*. Linhas 7 e 15: controles positivos; linhas 1, 3, 6, 8, 9, 11, 14 e 16: controles negativos; linhas 5 e 13: Ladder de 100 pares de bases (pb)

Depois da exclusão das porções correspondentes aos primers, obteve-se fragmentos de 355 nucleotídeos de cada produto amplificado do gene *dsb*, 339 nucleotídeos do gene 16S rRNA e 484 nucleotídeos do gene *P28*. A Tabela 1 apresenta os resultados da *Blast Analysis* com as seqüências disponíveis no GenBank. Esta nova cepa foi designada como isolado São Paulo de *E. canis*.

Os números de acesso no GenBank para as seqüências de nucleotídeos dos genes estudados são: *dsb* (DQ460715), 16S rRNA (DQ460714), *P28* (DQ460713).

A seqüência de aminoácidos da proteína *pdsb* apresentou-se idêntica ao isolado Jake de *E. canis* (118/118). Frente a outras espécies, apresentou 83,8% (99/118) de similaridade a *E. chaffeensis*, 79,6% (94/118) à *E. muris*, 78,8% (93/118) à IOE, 74,5% (88/118) à *E. ewingii* e 72,8% (86/118) à *E. ruminantium*.

A seqüência de aminoácido da proteína *p28* apresentou-se similar aos isolados Oklahoma 98,7% (159/161) e Jake 99,3% (160/161) de *E. canis*. Quando comparada a outras espécies apresentou 81,9% (132/161) similar à *E. chaffeensis*, 74,5% (120/161) à IOE, 72,6% (117/161) à *E. muris*, 63,7% (65/102) à *E. ewingii* e 58,3% (91/156) à *E. ruminantium*.

Tabela 1 – Similaridade entre o isolado São Paulo de *Ehrlichia canis* e as diferentes amostras de *Ehrlichia* spp, segundo os produtos amplificados dos genes *dsb*, 16S rRNA e *P28*. São Paulo - 2006

Espécie/isolado	% Similaridade (nucleotídeos idênticos/ total nucleotídeos)		
	<i>Ehrlichia canis</i> São Paulo		
	<i>dsb</i>	16S rRNA	<i>P28</i>
<i>E. canis</i> Jaboticabal	100,0% (355/355)	na	na
<i>E. canis</i> VDE	na	100,0% (339/339)	na
<i>E. canis</i> VHE	na	100,0% (339/339)	na
<i>E. canis</i> Florida	na	99,7% (338/339)	na
<i>E. canis</i> Jake	100,0% (355/355)	100,0% (339/339)	99,3% (481/484)
<i>E. canis</i> Oklahoma	na	99,7% (338/339)	99,5% (482/484)
<i>E. canis</i> Israel	na	99,7% (338/339)	na
<i>E. canis</i> Madrid	na	100,0% (339/339)	na
<i>E. canis</i> Kagoshima	na	100,0% (339/339)	na
<i>E. canis</i> Tailândia	na	100,0% (339/339)	na
<i>E. canis</i> Camarões	100,0% (355/355)	na	na
<i>E. canis</i> Germishuys	na	99,7% (338/339)	na
<i>E. chaffeensis</i> Arkansas	81,8% (288/352)	98,5% (334/339)	78,5% (351/447)
<i>E. chaffeensis</i> Jax	81,8% (288/352)	98,5% (334/339)	81,8% (384/469)
<i>E. ewingii</i>	76,5% (268/350)	98,2% (333/339)	79,7% (126/158)
<i>E. muris</i>	79,6% (282/354)	97,0% (329/339)	82,4% (281/341)
<i>E. ruminantium</i>	74,0% (259/350)	97,0%(329/339)	75,6% (189/250)
<i>Ehrlichia</i> IOE	79,3% (281/354)	97,3%,(330/339)	82,9% (283/341)

na: não avaliado

A tabela 2 apresenta as posições de divergência entre os nucleotídeos dos genes 16S rRNA e *P28* identificados no isolado São Paulo frente a outras amostras de *E. canis*.

Tabela 2 – Diferenças de nucleotídeo dos genes 16S rRNA e *P28* do isolado São Paulo de *Ehrlichia canis* frente a outros isolados, segundo a posição no gene estudado. São Paulo - 2006

Isolados de <i>Ehrlichia canis</i>	Posição dos nucleotídeos ^a						
	16S rRNA			<i>P28</i>			
	97	253	284	126	143	290	403
São Paulo	G	C	G	G	G	A	A
Jake	•	•	•	•	A	G	G
Oklahoma	A	•	•	A	A	•	•
Flórida	A	•	•	•	•	•	•
Israeli	•	•	nd	•	•	•	•
Germishuys	•	nd	•	•	•	•	•

^a Pontos representam nucleotídeos idênticos ao isolado São Paulo de *Ehrlichia canis*

nd: não determinado

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho relata o isolamento de uma nova cepa de *E. canis*, procedente de um cão com histórico recente de infecção, atendido no HOVET-FMVZ/USP. Em estudo anterior, Torres et al. (2002) no Rio de Janeiro, isolaram *E. canis* em células DH82, após infecção experimental em cão saudável, com sangue oriundo de cão clinicamente doente. Este mesmo procedimento foi realizado com sucesso no Capítulo I deste estudo, com o isolado Jaboticabal de *E. canis*. Neste Capítulo, o isolamento foi realizado diretamente a partir de um cão infectado naturalmente.

O cão atendido apresentou-se normal no momento do exame clínico. Porém, o exame hematológico revelou discreta anemia ($4,7 \times 10^6/\text{mm}^3$; hematócrito: 33%) e leucopenia ($4.700 \text{ cel}/\text{mm}^3$), mas trombocitopenia acentuada ($19.000/\text{mm}^3$). A trombocitopenia é o achado mais freqüente nos cães infectados, enquanto que a leucopenia parece ocorrer após a segunda e terceira semana pós-infecção (HASEGAWA, 2005; MACHADO, 2004). Estes resultados sugerem infecção crônica, pois nesta fase comumente se estabelece a pancitopenia, com acentuada queda do número de plaquetas (BULLA et al., 2004).

Segundo o histórico clínico, o cão havia sido tratado com 10mg/Kg de Doxiciclina diariamente por 21 dias e Imidocarb (5mg/Kg) a intervalos de 14 dias. Entretanto, houve a recidiva do quadro clínico, três semanas após tratamento. Nesse intervalo, o proprietário também alegou ter observado a presença de carrapatos. Ibqal e Rikihisa (1994), já haviam relatado o reisolamento de *E. canis* em cães tratados com Doxiciclina, tanto de sangue periférico como de órgão linfóides e discutiram sobre a possibilidade de falhas no tratamento antimicrobiano. Por outro

lado, há possibilidade do cão ter se reinfectado, pois foi observada a infestação por carrapatos após o término do tratamento. Sabe-se que o *R. sanguineus* está apto a transmitir *E. canis* por até 155 dias (LEWIS et al., 1977), além do que não há imunidade efetiva e duradoura contra nova infecção (COHN, 2003). Contudo, também não há como descartar uma possível falha na execução do tratamento prescrito pelo veterinário.

A monocamada de células DH82 apresentou-se positiva aos 14 dias pós-inoculação pela PCR e aos 21 dias no exame citológico, semelhante ao resultado de Torres et al. (2002) e Keysary et al. (1996), que também realizaram o cultivo primário de leucócitos antes da inoculação em células DH82. O protocolo de inoculação em células utilizado neste experimento apresentou resultado mais precoce que o utilizado no Capítulo I, com o isolado Jaboticabal. Por outro lado, o crescimento da taxa de infecção foi mais lento, chegando a altos índices de infecção apenas aos 80-90 dias pós-inoculação. O fato de o cão ter sido tratado previamente, pode ter influenciado na propagação do agente. Iqba e Rikihisa (1994) relataram o isolamento de *E. canis* após 51 dias da inoculação em DH82 a partir de cães tratados com Doxiciclina sete dias antes da colheita de sangue para o isolamento.

As comparações entre diferentes seqüências de nucleotídeos, referente ao gene 16S rRNA, revelaram alta conservação do isolado São Paulo frente a outras cepas de *E. canis*. Estes resultados concordam com a afirmação, de que as diferentes cepas de *E. canis* apresentam pouco polimorfismo, sugerindo uma origem comum, com ponto de divergência não muito distante (AGUIRRE et al., 2004; KEYSARY et al., 1996; UNVER et al., 2001). Adicionalmente, foi observada similaridade entre outras espécies de *Ehrlichia*, conforme relatado por Dumler et al.

(2001), de que há no mínimo 97% de identidade entre as espécies segundo o gene 16S rRNA.

O fragmento do gene *dsb* analisado demonstrou completa conservação (100%) entre as amostras de *E. canis*, em contraste com as outras espécies de *Ehrlichia*, o qual variou de 74% a 81% de similaridade. Estes resultados concordam com Kuyler Doyle et al. (2005a), os quais afirmam que o gene *dsb* é altamente conservado entre as espécies do gênero *Ehrlichia* (*E. ewingii* e *E. ruminantium* os mais divergentes e *E. muris* e IOE as mais similares). Mesmo assim, o gene possui regiões de ácido nucléico, suficientemente heterólogas, que permite ser utilizado como alvo específico para PCR. Estes resultados mostraram-se concordantes a análise da seqüência de aminoácidos da proteína DSB, que se revelou idêntica ao isolado Jake e divergente das outras espécies de *Ehrlichia*. Segundo McBride et al. (2002), a DSB possui até 87% de homologia entre as espécies *E. canis* e *E. chaffeensis*.

O gene *P28* do isolado São Paulo demonstrou-se conservado, quando comparados às amostras Jake e Oklahoma (99,3% e 99,5% respectivamente) isoladas nos Estados Unidos. McBride et al. (1999) observaram a conservação deste gene entre os isolados norte-americanos, sugerindo a inexistência de variação antigênica. Por outro lado, quando a seqüência do gene *P28* do isolado São Paulo foi comparado a duas amostras de *E. chaffeensis* (Arkansas e Jax), estas apresentaram similaridades diferentes (78,5% e 81,8% respectivamente). Estudos envolvendo *E. chaffeensis* têm demonstrado diversidade molecular do gene *P28*. A comparação deste gene em cinco diferentes isolados de *E. chaffeensis* revelou distinção entre as cepas estudadas com até 13% de divergência (YU et al., 1999).

Analisando a seqüência de aminoácidos na proteína p28, observou-se a quase total identidade dos isolados São Paulo, Jake (99,3%) e Oklahoma (98,7%). A proteína p28 ($\approx$ 30kDa) de *E. canis* tem sido descrita como um dos principais antígenos imunodominantes, e como é altamente conservada entre os isolados, tem sido seguramente indicada como antígeno diagnóstico e vacinal (MCBRIDE et al., 1999; MCBRIDE et al., 2000). No entanto, a p28 tem apresentado semelhança antigênica, quando comparada a proteínas homólogas de outras espécies, como da *E. chaffeensis* (REDDY et al., 1998). No presente trabalho foi observado que a semelhança de aminoácidos entre as espécies variou de 58% a 82%. Por essa estreita homologia protéica dentro do gênero *Ehrlichia*, sugere-se que a p28 faça parte da classe de proteínas codificadas por genes familiares (*multigene family*), e devem ser importantes durante o curso da infecção e até mesmo na evasão da resposta imune do animal infectado (MCBRIDE et al., 1999; MCBRIDE et al., 2000; OHASHI et al., 1998; YU et al., 1999).

Outros estudos avaliaram seqüências de genes, que codificam proteínas de membranas como a p120 (YU et al., 2000) e gp36 (KUYLER DOYLE et al., 2005b), sendo confirmada a presença de similaridade entre os isolados de *E.canis*, inclusive com a seqüência correspondente ao gene gp36 do isolado São Paulo.

Estes resultados sugerem, em termos evolutivos, que a *E. canis* foi recentemente introduzida no continente americano, justificando a reservada relação entre os diferentes isolados e espécies de *Ehrlichia*.

CAPITULO III

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) EM CÃES DO MUNICÍPIO DE MONTE NEGRO, RO. – AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma doença infecciosa severa que acomete os cães (*Canis familiaris*), causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, sendo a principal espécie a *Ehrlichia canis*. Sua ocorrência vem aumentando significativamente nos últimos anos em todas as regiões do Brasil e está veiculado ao seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como o “carrapato marrom do cão”, que se encontra disseminado por toda área urbana do Brasil.

No Brasil, o primeiro diagnóstico da erliquiose canina foi feito por Costa et al. (1973), em cão proveniente de Belo Horizonte. Posteriormente, a doença foi relatada acometendo aproximadamente 20 a 30% % dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados do Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2002).

A ampla variação clínica da erliquiose, aliada ao longo período de portador e a natureza nidícola do *R. sanguineus*, contribuíram para a disseminação da *E. canis*, tornando-a uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas nos países tropicais, sobretudo no Brasil (HASEGAWA, 2005).

Estudos epidemiológicos sobre a infecção por *E. canis* no Brasil têm sido realizados envolvendo a clínica da doença, seja avaliando a idade, sexo e raça dos cães ou mesmo a presença de carrapatos, na tentativa de se estabelecer fatores de riscos para a doença (DAGNONE et al., 2003, SANTARÉM, 2003; TRAPP et al., 2002). Porém, ainda não há dados de prevalência da infecção por *E. canis* nas populações caninas do Brasil.

Os relatos oficiais de ocorrência de erliquiose canina em áreas urbanas da região norte do Brasil ainda são escassos. Como houve uma grande expansão de populações do carrapato *R. sanguineus* nesta região nas últimas décadas (LABRUNA; PEREIRA, 2001), é bem provável que a doença venha ocorrendo freqüentemente em seus cães.

Nos anos de 2001 e 2003, foram amostrados cães da zona urbana e rural do município de Monte Negro, RO, os quais foram utilizados em estudos soropidemiológicos frente a agentes infecciosos como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp, *Leptospira* spp e *Rickettsia* spp (AGUIAR, 2004; CAÑON-FRANCO, 2002; CAVALCANTE, 2004; LABRUNA et al., 2005a). Estas amostras encontram-se armazenadas em banco de soros do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais (LDP), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) e ainda não foram averiguadas quanto à presença de anticorpos contra *Ehrlichia* spp.

Recentemente, foi verificado que os cães da área urbana de Monte Negro, encontravam-se parasitados quase que exclusivamente por uma única espécie de carrapato, o *R. sanguineus*. Por outro lado, os cães da área rural, eram parasitados quase que exclusivamente pelas espécies *Amblyomma ovale*, *Amblyomma oblongoguttatum* e *Amblyomma scalpturatum* (LABRUNA et al., 2005b).

Diante da falta de conhecimento referente à prevalência da infecção por *E. canis* em cães no Brasil e da escassez de estudos conduzidos sobre este agente na região norte do país, o presente trabalho objetivou determinar a prevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp em cães do município de Monte Negro, RO. As prevalências de cães soropositivos para *E. canis* foram analisadas com os dados da fauna de carrapatos presentes nas áreas rurais e urbanas de Monte Negro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O local de estudo, a obtenção das amostras e as metodologia empregadas estão descritas nos tópicos a seguir.

2.1 LOCAL DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

O estudo foi conduzido no município de Monte Negro, RO, localizado a oeste da Amazônia Brasileira (10°18' Sul; 63°14' Oeste; Figura 1). A região é caracterizada por solos mistos e vegetação equatorial amazônica de terra firme e clima quente e úmido, com pluviosidade elevada (média anual variando entre 1.440 mm nos meses de novembro a abril e 557 mm no período seco, de maio a outubro), com temperatura de 25 a 29°C e umidade relativa entre 70 a 80% durante o ano (CAMARGO et al., 2002).

Foram examinados 314 cães provenientes de ambientes urbano e rural, de idade e raças variadas e de ambos os sexos. Os parâmetros adotados para a amostragem dos cães urbanos foram prevalência esperada de 50%, precisão mínima de 7% e intervalo de confiança de 95%, de um total de 671 cães residentes na área urbana. Os cães do meio rural foram obtidos durante estudo conduzido na região, que avaliou doenças reprodutivas em bovinos (AGUIAR, 2004). Para determinar o número de fazendas a serem estudadas, utilizou-se prevalência estimada de 50%, precisão mínima de 10% e 95% de intervalo de confiança, de um total de 722 propriedades. Os cálculos para obtenção da amostragem dos cães, foram realizados com o auxílio do programa EPIINFO 6.04.

Fonte: SEDAM/IBGE

Figura 1 - Localização do Município de Monte Negro/RO

2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLOGICO

As amostras de sangue foram obtidas assepticamente por venopunção da cefálica ou jugular, com agulhas 21G apropriadas para tubos a vácuo. Os soros foram obtidos após a retração do coágulo, e estocados a -20° C até o momento das análises. Na ocasião da colheita de sangue, aplicou-se um questionário com intuito de verificar possíveis fatores de risco. Foram abordados a procedência dos cães (área urbana ou rural), idade e sexo. Nos cães urbanos, questionou-se a forma de criação (domiciliado e com acesso livre a rua), enquanto que nos cães do meio rural, foi abordado dado referente ao hábito de caça.

2.3 CONFECÇÃO DAS LÂMINAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

As lâminas foram confeccionadas conforme descrito por Ristic et al. (1972). Monocamadas de células DH82, inoculadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, apresentando 80-90% de infecção, foram desprendidas da garrafa com auxílio de raspadores apropriados (Corning®). A suspensão de células foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em Solução Tampão Fosfatada (PBS; pH 7,2; 0,0084M Na₂HPO₄, 0,0018M NaH₂PO₄ e 0,147M NaCl), para obter uma concentração de 10.000 células por ml. Adicionou-se então, 10µl da solução em cada orifício de lâminas apropriadas para a imunofluorescência, sendo secadas em temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas em acetona por 10 minutos e depois estocadas a -20°C até o momento do uso.

2.4 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A RIFI foi realizada a partir das células DH82 infectadas com o isolado Jaboticabal de *E. canis*, fixado em lâminas de imunofluorescência, como descrito por Ristic et al. (1972). Os soros dos cães foram diluídos a 1:40 (HARRUS et al., 1997; MCBRIDE et al., 2001) em PBS pH 7,2 e aplicados às lâminas com antígeno fixado, sendo incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, foi feita lavagem de 10 minutos em PBS 7,2. Após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado conjugado de coelho anti-IgG de cão (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) na diluição de 1:1000. Novamente as lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem, aplicou-se Glicerina pH 8,5 em cada lâmina e estas foram examinadas em microscópio de epifluorescência OLIMPUS®. As amostras consideradas positivas foram sucessivamente diluídas na razão dois, para obtenção do título final. Os soros controles positivo e negativo foram provenientes de um recente estudo de infecção experimental com o isolado Jaboticabal (HASEGAWA, 2005).

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

A soroprevalência obtida na RIFI foi calculada com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). As frequências encontradas para as variáveis obtidas no questionário foram analisadas pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2). A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$. As análises foram realizadas pelo programa estatístico EPIINFO 6.04.

3 RESULTADOS

Do total de 314 cães, 153 pertenciam à área urbana de Monte Negro (amplitude: 1-4 cães por quadra), enquanto 161 eram provenientes de 70 fazendas (amplitude: 1-6 cães por fazenda) de criação de bovinos. A tabela 1 apresenta a distribuição da população canina amostrada segundo o sexo e a idade.

Tabela 1 - Distribuição da população de cães amostrados do município de Monte Negro, RO. segundo sexo e faixa etária. São Paulo - 2006

Idade (meses)	Número de cães (%)		
	Machos	Fêmeas	Total
01 a 12	25 (50,0)	25 (50,0)	50 (16,0)
> 12 a 24	37 (66,0)	19 (34,0)	56 (18,0)
> 24	116 (60,4)	76 (39,6)	192 (61,0)
Não determinada	09 (56,3)	07 (43,7)	16 (05,0)
Total	187 (59,5)	127 (40,5)	314 (100,0)

No ambiente urbano, 105 (68,6%) cães tinham acesso livre à rua enquanto que 48 (31,4%) eram domiciliados. Quanto aos cães do ambiente rural, 93 (57,7%) praticavam a caça, enquanto 68 (42,3%) não caçavam. Das 314 amostras de soro, examinadas pela RIFI, 98 reagiram a partir da diluição 1:40 (Figura 2), obtendo-se uma prevalência geral de 31,2% (IC 95%: 26 – 36%) (Figura 3).

Figura 2 - Fotomicrografia de células DH82 infectadas com *Ehrlichia canis* com reação fluorescente positiva (setas). Notar a fluorescência positiva de forma difusa caracterizando aparentemente antígenos solúveis (A) no citoplasma celular, corpúsculos elementares e iniciais (B) bem como a presença de mórulas (C). Imunofluorescência Indireta; 40X

Figura 3 – Prevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães do município de Monte Negro, RO. São Paulo – 2006

Os títulos de anticorpos variaram de 40 a 40.960. O maior título foi observado no ambiente urbano. A tabela 2 e figura 4 apresentam as frequências obtidas segundo o título final de reação.

Tabela 2 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães reagentes a Reação de imunofluorescência Indireta (título ≥ 40), da área urbana e rural do município de Monte Negro, RO. São Paulo - 2006

Títulos	Cães de área urbana		Cães de área rural		Total	
	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%
40	15	25,9	09	22,5	24	24,5
80	10	17,3	09	22,5	19	19,4
160	06	10,4	08	20,0	14	14,3
320	02	3,4	06	15,0	08	8,1
640	02	3,4	03	7,5	05	5,1
1.280	02	3,4	02	5,0	04	4,1
2.560	03	5,2	01	2,5	04	4,1
5.120	05	8,6	0	0	05	5,1
10.240	09	15,5	0	0	09	9,2
20.480	03	5,2	02	5,0	05	5,1
40.960	01	1,7	0	0	01	1,0
Total	58	100	40	100	98	100

Figura 4 - Número (n) e freqüência (%) de cães reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título ≥ 40), contra antígenos de *Ehrlichia canis* segundo título final da reação. São Paulo - 2006

Quando as amostras foram estratificadas pelas áreas urbana e rural, as prevalências foram 37,9% (IC 95%: 30 – 45%; 58/153) e 24,8% (IC 95%: 18 – 31%; 40/161), respectivamente para ambas as áreas estudadas. Estes resultados, quando comparados pelo teste do χ^2 , foram significativamente diferentes ($\chi^2 = 5,6$; $P = 0,017$). A tabela 3 e a figura 5 apresentam as prevalências obtidas nas áreas urbana e rural.

Tabela 3 - Prevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de área urbana e rural do município de Monte Negro, RO

Área estudada	Nº cães avaliados	Nº cães positivos	Prevalência	IC - 95%*
Urbana	153	58	37,9%	30 – 46% ^a
Rural	161	40	24,8%	18 – 32% ^b
Total	314	98	31,2%	26 – 36%

* Letras diferentes indicam diferença entre áreas urbana e rural ($P < 0,05$)

Figura 5 – Frequência (%) e número (n) de cães reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título ≥ 40), contra antígenos de *Ehrlichia canis* segundo ambiente urbano e rural do município de Monte Negro, RO. São Paulo – 2006

Em relação à faixa etária, foi observado aumento da frequência de reações positivas, conforme o aumento da idade ($\chi^2 = 7,3$; $P = 0,006$) (Tabela 4). Esse resultado, não foi observado nos cães quando estratificados pelos diferentes ambientes ($P > 0,05$; Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 4 – Frequência (%) cães reagentes e não reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título ≥ 40) contra antígenos de *Ehrlichia canis*, segundo a faixa etária. São Paulo - 2006

Faixa etária (meses)	Número de cães (%)			Odds Ratio
	Amostrados	Não reagentes	Reagentes*	
0 – 12	50	41 (82,0)	09 (18,0) ^a	1,00
>12 – 24	56	41 (73,2)	15 (26,7) ^{a, b}	1,67
>24	192	121 (63,0)	71 (37,0) ^b	2,67
Indeterminada	16	13 (81,2)	03 (18,8)	-
Total	314	216 (69,0)	98 (31,0)	

* Letras diferentes nas colunas indicam $P < 0,05$, $\chi^2 = 7,3$; $P = 0,006$
Os cães com idade indeterminada não fizeram parte da análise estatística.

Tabela 5 - Frequência (%) de cães procedentes dos ambiente urbano e rural, reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título ≥ 40) contra antígenos de *Ehrlichia canis*, segundo a faixa etária. São Paulo - 2006

Faixa etária (meses)	Área urbana		Área Rural	
	Nº de cães		Nº de cães	
	Amostrados	Positivo (%)	Amostrados	Positivo (%)
0 to 12	19	4 (21,0) ^a	31	5 (16,1) ^a
>12 to 24	19	8 (42,1) ^a	37	7 (19,0) ^a
>24	112	45 (40,1) ^a	80	26 (32,5) ^a
Indeterminada	3	1 (33,3)	13	2 (15,3)
Total	153	58	161	40

* Letras iguais nas linhas e colunas indicam $P > 0,05$

Figura 6 – Frequência (%) e número (n) de cães reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título ≥ 40) contra antígenos de *Ehrlichia canis* segundo a faixa etária na totalidade dos cães segregados por área urbana e rural do município de Monte Negro, RO. São Paulo - 2006

Não foi observada diferença significativa quando a frequência de anticorpos foi analisada frente ao sexo ($\chi^2 = 1,05$; $P = 0,30$), mesmo quando foi analisado separadamente por área urbana ($\chi^2 = 0,65$; $P = 0,41$) e rural ($\chi^2 = 0,27$; $P = 0,60$). Quando as proporções de reatividade dentro de cada sexo (machos ou fêmeas) de ambientes diferentes foi comparada, verificou-se discreta diferença entre os machos reagentes do ambiente urbano (41,0%) e rural (26,8%; $\chi^2 = 3,6$; $P = 0,055$). Esta diferença não foi observada quanto às fêmeas (urbana: 33,3% e rural: 21,4%; $\chi^2 = 1,55$; $P = 0,212$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência dos cães reagentes e não reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título ≥ 40), contra antígenos de *Ehrlichia canis*, segundo o sexo nas diferentes áreas do município de Monte Negro, RO. São Paulo - 2006

Sexo	Número de cães (%)					
	Urbano			Rural		
	Amostrados	Não reagentes	Reagentes	Amostrados	Não reagentes	Reagentes
Macho	90	53 (59,0)	37 (41,0) ^a	97	71 (73,2)	26 (26,8) ^a
Fêmea	63	42 (66,7)	21 (33,3) ^a	64	50 (78,2)	14 (21,8) ^a
Total	153	95	58	161	121	40

Letras iguais nas colunas e linhas representam $P > 0,05$

Dos 105 cães da área urbana que tinham acesso a rua, 41 (39,0%) foram sororeagentes a RIFI (título ≥ 40). Porém, não foi observada diferença significativa ($\chi^2 = 0,06$; $P = 0,80$) quando comparado à frequência verificada nos cães domiciliados [35,4% (17/48)].

A variável caça, analisada nos cães do meio rural, não apresentou diferença significativa ($\chi^2 = 0,27$; $P = 0,60$). Dos 93 cães que tinham esse hábito, 25 (27%) foram sororeagentes a RIFI (título ≥ 40), enquanto que 22% (15/68) que não

praticavam foram sororeagentes. A tabela 7 ilustra as freqüências de sororeagentes segundo o tipo de criação na área urbana e o hábito de caça na área rural do município de Monte Negro, RO.

Tabela 7 – Freqüência (%) e valor de Qui-quadrado (χ^2) dos cães amostrados, não reagentes e reagentes a Reação de Imunofluorescência Indireta (título $\geq$ 40) contra antígenos de *Ehrlichia canis* segundo o tipo de criação na área urbana e hábito de caça na área rural do município de Monte Negro, RO. São Paulo - 2006

Variável	Cães (%)			χ^2	P
	Amostrados	Não reagentes	Reagentes		
Área urbana					
Criação					
Domiciliado	48	31 (65,0)	17 (35,0)	0,06	0,80
Acesso livre a rua	105	64 (61,0)	41 (39,0)		
Área rural					
Hábito de caça					
Não	68	53 (78,0)	15 (22,0)	0,27	0,60
Sim	93	68 (73,0)	25 (27,0)		

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a prevalência da infecção por *Ehrlichia canis* em cães da cidade de Monte Negro, RO, demonstrando soroprevalência de 31,2% (98/314). Este é o primeiro inquérito epidemiológico em cães da região norte do Brasil, sendo também pioneiro por comparar a infecção por *E. canis* em cães de área urbana e rural. Além disso, este foi o primeiro trabalho a determinar a prevalência de *E. canis* no Brasil, pois foi o único que partiu de uma amostragem estatisticamente calculada para representar uma população de cães, sem efeitos tendenciosos de amostragem. Todos os inquéritos já realizados no Brasil basearam-se em amostras viciadas, pois restringiram-se a cães atendidos em clínicas e hospitais veterinários, não representando uma população real de cães.

O teste sorológico é uma importante ferramenta para obtenção de informações epidemiológicas de diversas enfermidades. A RIFI, utilizada neste estudo para averiguar a infecção por *E. canis* em cães, indica apenas que houve ou há a infecção no animal, não sendo capaz de identificar a espécie envolvida, decorrente da presença de reações cruzadas entre as espécies de *Ehrlichia* spp (NDIP et al., 2005; WANER et al., 2001). O ponto de corte adotado neste estudo foi de 40. O mesmo utilizado na RIFI de McBride et al. (2001), que observaram boa correlação com a reação de “*Western blotting*”.

Este é o primeiro inquérito soroepidemiológico realizado em cães da América do Sul. Em outras localidades, os valores de prevalência encontrados, variaram em torno de zero a 50% na América do Norte (MURPHY et al., 1998; RODGER et al., 1989; RODRIGUES-VIVAS et al. 2005; YAMANE, et al., 1994), dois a 20% na Europa (PUSTERLA et al., 1998; SAINZ et al., 1996), 30% em Israel

(BANETH et al., 1996) e 32 a 68% no continente africano (DAVOUST et al., 2005; MATHEWMAN et al., 1993; NDIP et al., 2005). Em trabalho realizado na Austrália, Mason et al. (2001) verificou ocorrência de infecção em 2% dos cães testados. O resultado encontrado no presente trabalho apresentou valores de prevalência similares aos de outros países que estão entre as zonas tropical e subtropical, concordando com a afirmação de Keefe et al. (1982), de que cães situados nessa zona climática apresentam maiores freqüências de infecção por *E. canis*.

No presente estudo, foi observado ocorrência de anticorpos anti-*E. canis* em 37,9% (58/153) dos cães urbanos. Em recente estudo realizado por Labruna et al. (2005b), no ano de 2000, 43% dos cães urbanos de Monte Negro encontravam-se infestados pelo *R. sanguineus*, e no ano de 2001, estes representavam 32% da população canina da cidade. Segundo os autores, os cães urbanos de Monte Negro eram parasitados quase que exclusivamente pela espécie *R. sanguineus*. Por outro lado, verificaram que os cães rurais eram parasitados quase que exclusivamente pelos carrapatos *A. ovale*, *A. oblongoguttatum* e *A. scalpturatum* e menos frequentemente por *R. sanguineus*. Destes carrapatos, 121 *A. ovale*, 30 *A. oblongoguttatum* e 35 *A. scalpturatum* foram averiguadas pela PCR a fim de pesquisar a presença de DNA de *Ehrlichia* spp, mas não foram detectadas amostras positivas (informação verbal³). Estes achados corroboram com os resultados do presente trabalho, onde foi verificada maior prevalência nos cães urbanos do que nos cães rurais ($P < 0,05$). A ocorrência encontrada nos cães da área rural de 24,8% (40/161), condiz com os poucos relatos de infestação por *R. sanguineus* nesses cães e com os resultados negativos da PCR dos carrapatos *A. ovale*, *A. oblongoguttatum* e *A. scalpturatum*.

³ Informação fornecida por Labruna, M. B. (FMVZ – USP, Campus de São Paulo) em 2003.

A presença de alguns cães do ambiente rural com altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* (20.480) sugere infecção homóloga e reforçam a presença da *E. canis* em cães do ambiente rural. Num estudo preliminar com os cães desta região, Aguiar (2004), discutiu a possibilidade da movimentação dos cães urbanos em ambientes rurais (principalmente porque muitos produtores rurais residiam na cidade, e frequentemente levavam os cães às áreas rurais) e vice-versa. É bem provável que a movimentação de cães entre os diferentes ambientes e a presença da infestação pelo carrapato *R. sanguineus* nestes cães contribuíram para a ocorrência da infecção nos cães da zona rural.

No presente estudo foi observado aumento da frequência de anticorpos conforme o aumento da idade dos cães ($P < 0,05$). Entretanto, quando esta análise foi realizada por ambientes, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$). Como havia grande infestação por *R. sanguineus* nos cães do ambiente urbano, estes provavelmente adquiriram a infecção nos primeiros meses de vida. Por isto, não foi constatada associação entre o acesso à rua e a ocorrência de anticorpos anti-*E. canis* nos cães deste ambiente. A ocorrência de anticorpos anti-*E. canis*, quando avaliada segundo o sexo, não apresentou diferença entre machos e fêmeas. O sexo parece não ter importância epidemiológica na infecção por *E. canis*, conforme relatado por Baneth et al. (1996), Rodrigues-Vivas et al. (2005) e Sainz et al. (1996).

Na tentativa de estabelecer risco para a infecção no ambiente rural, avaliamos a prática de caça. Entretanto, não observamos tal associação. Como já foi amplamente discutido, não foi observado indícios de infecção por outra espécie de *Ehrlichia* que possam ser veiculadas por outros gêneros de carrapatos, como *Amblyomma* spp.

CAPITULO IV

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por carrapatos, representam um emergente problema em animais e humanos, pois vem causando sérias doenças em regiões tropicais e subtropicais. Recentemente, os carrapatos têm sido associados a doenças em cães (*Canis familiaris*) de zonas temperadas e em ambientes urbanos (SHAW et al., 2001), pois estão bem adaptados a transmitir agentes virais (Arbovirus), protozoários (*Babesia* spp, *Hepatozoon* spp e *Theileria* spp) e bacterianos (*Neorickettsia* spp, *Ehrlichia* spp, *Rickettsia* spp, *Anaplasma* spp e *Borrelia* spp) (GREENE, 1998).

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, nos cães, identificada parasitando monócitos e granulócitos (SHAW et al., 2001). A única espécie descrita até o momento no Brasil é a *Ehrlichia canis*, que vem acometendo aproximadamente 20% a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados do Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio

Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2002).

A doença está veiculada ao seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como o “carrapato marrom do cão”, que se encontra disseminado por toda área urbana do Brasil. Originário da África e única espécie do gênero *Rhipicephalus* nas Américas, o *R. sanguineus* foi introduzido no Brasil possivelmente a partir do século XVI, com a chegada dos colonizadores europeus e seus animais domésticos. *R. sanguineus* é um carrapato trioxeno e possui hábito nidícola, o que torna os cães sempre sujeitos a grandes infestações, visto que este carrapato tem grande capacidade de se multiplicar e se manter em ambientes urbanos (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

A ampla variação do quadro clínico da EMC, aliado ao longo período de portador e a natureza nidícola do *R. sanguineus*, contribuíram para a disseminação da *E. canis*, tornando-a uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas nos países tropicais. No Brasil, as condições climáticas são ideais para manutenção do vetor, além do que, a grande população canina errante no nosso país contribuiu para a disseminação deste carrapato (BULLA et al., 2004). A infestação por *R. sanguineus*, tem sido considerada importante fator de risco para a infecção por *E. canis* (SANTARÉM, 2003; TRAPP et al., 2002).

No carrapato ocorre transmissão transestadial, mas não transovariana, o que faz do cão, o reservatório do agente. Portanto, a infecção do hospedeiro vertebrado é transmitida pelos estágios de ninfa e adulto do carrapato (GROVES et al., 1975). Recentemente, Bremer et al. (2005) experimentalmente demonstrou que machos adultos de *R. sanguineus*, na procura de uma fêmea para cópula, podem se

infectar e transmitir a doença a diferentes cães de um mesmo local (transmissão intraestadial).

No Brasil, a presença de *E. canis* em carrapatos ainda não foi relatada. Poucos estudos abordaram a infecção natural por *E. canis* em carrapatos *R. sanguineus*. No continente americano, Murphy et al. (1998) nos Estados Unidos e Unver et al. (2001) na Venezuela realizaram a identificação do agente em carrapatos *R. sanguineus*. Por outro lado, estudos realizados no Japão (INOKUMA et al., 2003) e na Tunísia (SARIH et al., 2005) não obtiveram êxito na identificação de carrapatos infectados por *E. canis*.

Ao contrário do que ocorre com a EMC, a prevalência de carrapatos *Amblyomma americanum* infectados por *E. chaffeensis* tem sido verificada. Relatos norte-americanos estimaram a frequência mínima de infecção, variando de um a 10% (BURKET et al., 1998; STEINER et al., 1999; WHITLOCK et al., 2000). Prevalência menor ainda, foi detectada na infecção por *E. ewingii* em *A. americanum*, que ficou em torno de 0,5% de carrapatos amostrados nos Estados Unidos (WOLF et al., 2000).

Diante da importância da EMC na clínica veterinária brasileira, da frequência e disseminação do carrapato *R. sanguineus* no Brasil, e da sua importância como agente difusor de enfermidades transmissíveis, o presente estudo procurou avaliar a prevalência da infecção por *E. canis* em diferentes populações de carrapatos *R. sanguineus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor compreensão a metodologia está dividida em tópicos.

2.1 LOCAL DO ESTUDO

Foram amostradas populações de carrapatos *R. sanguineus* de diferentes localidades, onde apresentavam pelo menos um cão suspeito de EMC: população 1: município de Monte Negro, RO (10°18' Sul; 63°14' Oeste), amostrados de uma residência em outubro de 2004; população 2: município de Jundiaí, SP (23°11' Sul; 46°52' Oeste), amostrado de um canil comunitário em dezembro de 2004; população 3: município de São Paulo (designada São Paulo I), SP (23°32' Sul; 46°37' Oeste) amostrado de um canil em maio de 2005. Uma quarta população foi obtida de uma comunidade do município de São Paulo (designada São Paulo II) em janeiro de 2005. As duas últimas populações procedentes da mesma cidade são geograficamente separadas (bairros Butantã e Jardim Bonfiglioli, respectivamente). Para confirmar se as populações de carrapatos eram oriundas de local onde havia infecção por *E. canis*, foram amostrados sangues de cinco cães contactantes de Monte Negro, dois de Jundiaí, e um de cada local de São Paulo.

2.2 AMOSTRAGEM E COLHEITA DE CARRAPATOS

O número mínimo de carrapatos a serem amostrados em cada população foi determinado com auxílio do programa EPIINFO 6.04. Este cálculo foi realizado para populações infinitas, utilizando-se prevalência esperada de 10%, erro

estatístico de 5% e intervalo de confiança (IC) de 95%. A prevalência de 10% de carrapatos infectados foi extrapolada de estudos sobre prevalência de carrapatos *Amblyomma americanum* infectados por *E. chaffeensis* (PADDOCK; CHILDS, 2003). No laboratório, os espécimes foram agrupados em grupos (*pools*) de três carrapatos, mantidos em álcool isopropílico 100% até a extração de DNA total ser realizada.

Na população 1 os carrapatos foram colhidos dos cães, sendo a maioria, fêmeas parcialmente ingurgitadas. Na população 2 os carrapatos foram tanto adultos não alimentados e teleóginas (recém desprendidas dos cães) das paredes dos canis. Todos os carrapatos das populações 3 e 4 foram adultos não alimentados retirados do ambiente.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DOS CÃES SUSPEITOS E DOS CARRAPATOS

A extração de DNA do sangue dos cães presentes nas localidades foi realizada com kit de extração “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, Ca) conforme manual de instrução.

Os carrapatos foram secos ao ar livre e posteriormente triturados em microtubos eppendorf com auxílio de ponteiros de 1,0 mililitros (ml) estéreis. Após trituração, o DNA total foi extraído com auxílio do kit de extração “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, Ca). Como não há instruções para utilização em carrapatos, utilizou-se o manual de extração para insetos. Do município de Jundiaí, as teleóginas foram dissecadas com lâminas de bisturis em placa de petri com solução Tampão Tris-EDTA (10mM TrisCl, 1 mM EDTA) pH 8,0 estéril, para retirada das glândulas salivares, as quais tiveram o DNA extraído posteriormente com o kit de extração “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, Ca).

2.4 PCR

Para a amplificação, utilizou-se uma PCR com uma reação contendo: 100-400 ng de DNA; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega[®]); 0,4 µM de cada iniciador (*primer*) *dsb*: Dsb-330 (senso: 5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e Dsb-729 (anti-senso: 5'-CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3'); 1,25 U de Taq Polimerase (Platinum[®] Taq DNA polymerase - Invitrogen); solução tampão (pH 8,4) contendo 50 mM de KCL; 20 mM Tris-HCL e 3 mM de MgCl₂ (KUYLER DOYLE et al., 2005a). O volume foi completado com água MilliQ autoclavada para completar 50µl e a amplificação foi efetuada em termociclador automático (Eppendorf[®]). Em cada série foram incluídos controles positivo (DNA de *E.canis*) e negativo (água).

Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos, seguida de uma seqüência de 50 ciclos repetidos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, seguidos de cinco minutos de extensão final a 72 °C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5-2% em ácido-EDTA tris-bórico tamponado, revelados com brometo de etídio em transiluminação ultravioleta. Compararam-se os fragmentos de DNA com marcadores de DNA de 100 pares de base (pb; Fermentas Life Science[®] Burlington, On), considerando como positivas, as amostras cujos produtos apresentaram tamanho aproximado de 409 pb. Em cada série foram incluídos controles positivo (DNA de *E.canis*) e negativo (água).

2.5 SEQÜENCIAMENTO

Foram seqüenciados os produtos da PCR de ao menos um cão amostrado de cada localidade. Dos carrapatos, foram seqüenciados fragmentos amplificados de um pool da população 1 (Monte Negro), quatro pools da população 2 (Jundiaí) e cinco pools da população 3 (São Paulo I). Os produtos da PCR foram purificados com Kit comercial ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, Oh) conforme manual de instruções. As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados foram analisadas em seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções. As seqüências obtidas foram alinhadas com outro isolado de *E. canis* disponível no GenBank, utilizando o programa MegAlign do pacote DNASTAR (Lasergene). O número de acesso da seqüência de *dsb* obtida no GenBank usada para comparação foi AF403710, correspondente ao isolado Jake de *E. canis*.

2.6 PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência de carrapatos infectados foi calculada como Frequência Mínima de Infecção (FMI) (BURKET et al., 1998; WHITLOCK et al., 2000). Este cálculo foi realizado tanto para o total de pools das três populações, quanto para os pools de cada localidade. As diferentes frequências verificadas entre as populações foram analisadas pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2) ou pelo teste exato de Fisher (Fisher) quando necessário. A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$. As análises foram realizadas pelo programa estatístico EPIINFO 6.04.

3 RESULTADOS

Os resultados foram descritos por etapa para uma melhor compreensão.

3.1 COLETA DE CARRAPATOS

Os carrapatos amostrados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Número e frequência (%) de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* amostrados em quatro diferentes populações. São Paulo - 2006

População (Local)	Número de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (%)				Total (%)
	Parasitando cão		Vida livre		
	Não ingurg.	Ingurgitado	Não ingurg.	Ingurgitado	
1 (Monte Negro)	96 (58,0)	69 (42,0)	0	0	165 (27,0)
2 (Jundiaí)	0	0	90 (55,6)	72 (44,4)	162 (26,5)
3 (São Paulo I)	0	0	162 (100)	0	162 (26,5)
4 (São Paulo II)	0	0	120 (100)	0	120 (20,0)
Total	96 (15,5)	69 (11,0)	372 (61,0)	72 (12,5)	609 (100)

3.2 PCR E FMI

Quatro cães da população 1 (Monte Negro/RO) e os cães amostrados das populações 2 e 3 (Jundiaí e São Paulo I) foram positivos ao PCR para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. Já o cão procedente da população 4 foi negativo. Baseada nos resultados da PCR, a FMI foi calculada para as populações 1, 2 e 3 e para o total de carrapatos amostrados. Para cada pool positivo assumiu-se conter, no mínimo, um carrapato infectado. A tabela 2 e a figura 1 apresentam os resultados da FMI. A população 1 (Monte Negro) apresentou prevalência de 2,4% (IC 95%:0,7 – 5,7%), a população 2 (Jundiaí) de 6,2% (IC 95%: 3,0 – 10,7%) e a população 3 (São Paulo I)

de 3,7% (IC 95%: 1,5 – 7,0%). Os resultados, quando comparados entre si, apresentaram-se estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$). A prevalência total de infecção por *E. canis* em *R. sanguineus* foi de 4,1% (IC 95%: 2,5 – 6,1%). Contrariamente, a população 4 (São Paulo II) apresentou-se negativa e este resultado, quando comparado à população de carrapatos positivos, foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Prevalência da infecção por *Ehrlichia canis* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, calculada como Frequência Mínima de Infecção (FMI) com intervalo de Confiança de 95% (IC 95%). São Paulo - 2006

Populações (Local)	Número total			FMI	IC 95%
	Carrapatos	Pools	Pools positivos		
1 (Monte Negro)	165	55	04	2,4 ^a	0,7 – 5,7
2 (Jundiaí)	162	54	10	6,2 ^a	3,0 – 10,7
3 (São Paulo I)	162	54	06	3,7 ^a	1,5 – 7,5
Total	489	163	20	4,1	2,5 – 6,1

letras iguais na mesma coluna indicam $P > 0,05$

Figura 1. Frequência Mínima de Infecção (FMI) das quatro populações de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* infectados por *Ehrlichia canis*. São Paulo – 2006

A tabela 3 apresenta a FMI obtida das diferentes fontes de DNA (ingurgitados, glândulas salivares e não ingurgitados). Na população 1 (Monte Negro), as FMI encontradas para carrapatos ingurgitados (4,3%; 3/69) e não ingurgitados (1,0%; 1/96) foram estatisticamente semelhantes (Fisher = 1,7; $P = 0,30$). O mesmo ocorreu quando se comparou a frequência dos grupos composta pelas glândulas salivares dos carrapatos ingurgitados (6,9%; 5/72) e dos não ingurgitados (5,5%; 5/90) da população 2 (Jundiaí) ($\chi^2 = 0,0$; $P = 0,90$).

Tabela 3 – Número (n) de carrapatos processados e número de pools infectados (infect) para *E. canis* (FMI) nos diferentes grupos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, segundo as diferentes localidades. São Paulo - 2006

Local	Grupos de carrapatos						Total
	Ingurgitados		Gl. Salivar		Não ingurgitados		Infec. (FMI)
	n	Infec (FMI)	n	Infec (FMI)	n	Infec (FMI)	
1 (Monte Negro)	69	3 (4,3)*	0	0	96	1 (1,0%)*	4 (2,4)
2 (Jundiaí)	0	0	72	5 (6,9)**	90	5 (5,5)**	10 (6,2)
3 (São Paulo I)	0	0	0	0	162	6 (100,0)	6 (3,7)

*¹ Fisher = 1,7; $P = 0,30$

**² $\chi^2 = 0,0$; $P = 0,90$

3.3 SEQUENCIAMENTO

Após exclusão das porções correspondentes aos primers, foram obtidos fragmentos de 355 nucleotídeos de cada produto amplificado, e todas as seqüências se mostraram idênticas entre si. Quando elas foram comparadas com as seqüências disponíveis no GenBank, através de *Blast Analysis*, apresentaram 100% de similaridade com a seqüência de *E. canis* (AF403710).

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho averiguou a prevalência da infecção por *E. canis* em carrapatos *R. sanguineus*, considerado como o principal vetor da EMC no Brasil e em todo o mundo. Pesquisa de *E. canis* em *R. sanguineus* nunca fora averiguada nos moldes deste trabalho, de forma a ser pioneiro neste tipo de estudo. Estudos anteriores analisaram a presença de *E. canis* em pequenas amostras de *R. sanguineus*, sem a preocupação de avaliar a prevalência da infecção (INOKUMA et al., 2003; MURPHY et al., 1998; UNVER et al., 2001).

Todas as seqüências obtidas dos cães e dos carrapatos, das diferentes regiões estudadas no presente trabalho, apresentaram-se idênticas à seqüência correspondente do gene *dsb* de *E. canis* disponível no GenBank (AF403710). Atualmente a *E. canis* é a única espécie do gênero *Ehrlichia* identificada no Brasil, e todas que foram identificadas pelo gene *dsb* apresentaram-se idênticas entre si, como os isolados Jaboticabal e São Paulo e as cepas identificadas por Rosa (2005).

Do total de pools positivos, verificou-se FMI de 4,1% (20/489). As populações de carrapatos, onde foi detectada a presença de *E. canis*, foram oriundas de locais onde havia ao menos um cão portador. Por outro lado, a quarta população (população 4 – São Paulo) analisada, não apresentou carrapatos positivos, tão pouco a presença de cão portador. O cão doméstico é considerado o principal reservatório da *E. canis*, uma vez que a transmissão transovariana do agente não ocorre no carrapato *R. sanguineus* (GROVES et al., 1975).

Todos os carrapatos da população 1 (Monte Negro) foram amostrados parasitando cães, tanto por adultos ingurgitados como os não ingurgitados. De acordo com Burket et al. (1998), a utilização de carrapatos ingurgitados pode interferir na PCR, pois a presença do sangue pode ser prejudicial para obtenção de

DNA de qualidade. Com a utilização de um Kit comercial de extração (DNeasy Tissue Kit[®]), aparentemente a qualidade do DNA não foi alterada, pois a presença do DNA foi confirmado por eletroforese em gel de agarose (dado não apresentado). Nesta população, constatamos a FMI em 2,4% (4/165) dos carrapatos. As fêmeas ingurgitadas apresentaram 4,3% (03/69) de infecção enquanto que 1,0% (01/96) dos carrapatos não ingurgitados apresentaram-se positivos ($P > 0,05$).

Já na população 2 (Jundiaí), todos os carrapatos eram de vida livre, e as teleóginas foram dissecadas para retirada da glândula salivar. Os resultados obtidos nestas duas fontes de DNA não apresentaram diferença significativa [$P > 0,05$; 6,9% (5/72) - glândula salivar e 5,5% (5/90) - carrapatos inteiros não ingurgitados]. A PCR da glândula salivar mostrou-se útil para a detecção do agente, já que aparentemente é o ultimo local de instalação do agente no carrapato (SMITH et al., 1976), minimizando dessa forma, a detecção de DNA proveniente do sangue infectado ingerido no hospedeiro vertebrado. Todos os carrapatos da população 3 (São Paulo I) eram de vida livre, sendo verificada FMI de 3,7% (06/162).

A FMI das três populações foi estabelecida em 4,1 % (2,5 – 6,1%; 95% IC) e para cada uma delas também não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$). Como os resultados obtidos pela FMI foram relativamente baixos, sugere-se que nem todo sangue infectado ingerido pelos carrapatos resulta na infecção do vetor. Este dado foi comprovado por Bremer et al. (2005), os quais demonstraram que apenas 50 a 70% dos carrapatos *R. sanguineus* que se alimentaram quando ninfas em cães experimentalmente infectados com *E. canis* foram positivos.

A presença de carrapatos adultos que parasitaram (quando ninfa) cães em fase subclínica ou crônica pode também influenciar a baixa taxa de infecção, já que é na fase aguda que o encontro do agente na circulação sanguínea é mais freqüente

(LEWIS et al., 1977). Isto tem sido observado na infecção por *E. chaffeensis* em *A. americanum* e no veado da cauda branca (*Odocoileus virginianum*). A prevalência de *E. canis* em carrapatos *A. americanum* nos Estados Unidos variou de 3 a 10% (BURKET et al., 1998; STEINER et al., 1999; WHITLOCK et al., 2000). Por outro lado, Arens et al. (2003) observaram alta prevalência sorológica (87%), com baixa detecção (23%) do agente no sangue dos animais (veado da cauda branca), sugerindo a existência de animais portadores crônicos da infecção, contribuindo para a baixa taxa de infecção observada nos carrapatos.

REFERENCIAS⁴

AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Leptospira* spp em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia: Estudo de possíveis fatores de risco.** 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

ANDERSON, B. E. J.; SUMNER, W.; DAWSON, J. E.; TZIANABOS, T.; GREENE, C. R.; OLSON, J. G.; FISHBEIN, D. B.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; HOLLOWAY, B. P.; GEORGE, E. H. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 775-780, 1992.

ARENS, M. Q.; LIDDELL, A. M.; BUENING, G.; GAUDREAULT-KEENER, M.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; BULLER, R. S. STORCH, G. Detection of *Ehrlichia* spp. in the blood of wild White-Tailed Deer in Missouri by PCR and serologic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1263-1265, 2003.

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

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

BRETSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential aveluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsoni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2645-2651, 1998.

⁴ Conforme as diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4^a. ed. São Paulo: FMVZ-USP. 2003.

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

BURKET, C. T.; VANN, C. N.; PINGER, R. R.; CHATOT, C. L.; STEINER, F. E. Minimum Infection Rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in Southern Indiana. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 653-659, 1998.

CAMARGO, L. M. A.; MOURA, M. M.; ENGRACIA, V.; PAGOTTO, R. C.; BASANO, S. A.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P.; BEIGUELMAN, B.; KRIEGER, H. A rural community in a Brazilian Western Amazonian region: some demographic and epidemiological patterns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 193-195, 2002.

CAÑÓN-FRANCO, W. A. **Prevalência de anticorpos anti-Neospora caninum e Toxoplasma gondii em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia**. 2002. 131 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 73-86, 2004.

CAVALCANTE, G. T. **Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em humanos e animais domésticos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia**. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinic of Small Animal**. v. 33, p. 863-884, 2003.

COSTA, J. O.; SILVA, M.; BATISTA Jr, J. A.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.

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

DAVOUST, B.; BOURRY, O.; GOMEZ, J.; LAFAY, L.; CASALY, F.; LEROY, E.; PARZY, D. Surveys on seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis among dogs living in the Ivory Coast and Gabon and evaluation of a quick commercial test kit dot-ELISA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4^a, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...**Logroño: American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005. p. 06.

DAWSON, J. E.; RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FISHBEIN, D. B. Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 564-567, 1991.

DAWSON, J. E.; CANDALL, F. J.; GEORGE, V. G.; ADES, E. W. Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. **Pathobiology**, v. 61, p. 293-296, 1993.

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

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. 934p.

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, n. 7, p. 937-940, 1975.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 36, p. 431-447, 1997.

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. 2005. 134 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HELMET, I. E.; LEWIS Jr, G. E.; HUXSOLL, D. L.; STEPHENSON, E. H. Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocytes cultures. **Cornell Veterinary**, v. 70, p. 37-42, 1980.

INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 343-348, 2003.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1644-1649, 1994.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p. 1344.

JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; CROW, D. W.; KOCAN, K. M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 277-288, 1998.

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

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

KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 521-523, 2001.

KUYLER DOYLE, C.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y.; 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 PCR of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005a.

KUYLER DOYLE, C.; CARDENAS, A. M.; AGUIAR, D. M.; LABRUNA, M. B.; NDIP, L. M.; YU, X. J.; MCBRIDE, J. W. A molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 Tandem Repeats among isolates from different geographic localization **Annals New York Academy of Science**, v. 1063, p. 433-435, 2005b.

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

LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of Rickettsia infection in dogs from the urban and rural áreas of Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4^a, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...**Logroño: American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005a. p. 167.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic & Applied Acarology**. v. 10, p. 17-32, 2005b.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsiosis: current approach to diagnosis on fan old and new rickettsial disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2715-2727, 1997.

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.

MACHADO, R. Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004. Suplemento 1.

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

MATHEWMAN, L. A.; KELLY, P. J.; MAHAN, S. M.; SEMU, D.; TAGWIRA, M.; BOBADE, P. A.; BROUQUI, P.; MASON, P. R.; RAOULT, D. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently health dogs in Zimbabwe. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, n. 3, p. 111-115, 1993.

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

MCBRIDE, J. W.; NDIP, L. M.; POPOV, V. L.; WALKER, D. H. Identification and functional analysis of an immunoreactive DsbA-like thio-disulphide oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2700-2703, 2002.

MCBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. A conserved, transcriptionally active p28 multigene locus of *Ehrlichia chaffeensis*, **Gene**, v. 254, p. 245-252, 2000.

MCBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-Kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnosis antigen. **Clinical and Diagnostic laboratory Immunology**, v. 6, n. 3, p. 392-399, 1999.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serological survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 325-339, 1998.

NDIP, L. M.; NDIP, R. N.; ESEMU, S. N.; DICKMU, V. L.; FOKAM, E. B.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1-2, p. 59-66, 2005.

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

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 37-64, 2003.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; SHORE, G. M.; BARTLEY, D. C.; ELIE, R. C.; MCQUADE, J. G.; MARTIN, C. R.; GOLDSMITH, C. S.; CHILDS, J. E. Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strain from patients with fatal ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2496-2502, 1997.

PEREZ, P.; BORDOR, M.; ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia canis* detection in symptomatic humans in Venezuela. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4^a, 2005, Logroño, Espanha.

Anais... Logroño: American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005. p. 45.

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.

PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J. B.; DEPLAZES, P.; WOLFENSBERGER, C.; MÜLLER, W.; HÖRAUF, A.; REUSCH, C.; LUTZ, H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of Canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3460-3462, 1998.

REDDY, G. R.; SULSONA, C. R.; BARBET, A. F.; MAHAN, S. M.; BURRIDGE, M. J.; ALLEMAN, A. R. Molecular characterization of a 28kDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichiae. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 247, n. 3, p. 636-643, 1998.

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

RODGER, S. J.; MORTON, R. J.; BALDWIN, C. A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsia*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **Journal of Veterinary diagnosis Investigation**, v. 1, p. 154-159, 1989.

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

ROSA, C. **Identificação molecular de *Ehrlichia* spp a partir de amostras de sangue de cães infectados naturalmente na região da Grande São Paulo**. 2005, 74 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis***. 2003. 127 f. Tese (Doutorado). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Botucatu, 2003.

SARIH, M.; M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUT, A.; GERN, L.; BARANTON, G.; POSTIC, D. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Marocco. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1127-1132, 2005.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74-80, 2001.

SHIBATA, S. I.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C.; ITO, T. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1331-1338, 2000.

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 119-126, 1976.

STEINER, F. E.; PINGER, R. R.; VANN, C. N. Infection rates of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) and prevalence of *E. chaffeensis*-reactive antibodies in white-tailed Deer in Southern Indiana, 1997. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, p. 715-719, 1999.

STEPHENSON, E. H.; OSTERMAN, J. V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 11, p. 1815-1819, 1977.

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

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a Hospital population in south Brazil. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 365, 2002.

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.

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

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

WHITLOCK, J. E.; FANG, Q. Q.; DURDEN, L. A.; OLIVER JR, J. H. Prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from the Georgia Coast and Barrier Islands. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 276-280, 2000.

WOLF, L.; MCPHERSON, T.; HARRISON, B.; ENGBER, B.; ANDERSON, A.; WHITT, P. Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2795, 2000.

YAMANE, I.; GARDNER, I. A.; RYAN, C. P.; LEVY, M.; URRICO, J.; CONRAD, P. A. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 18, p. 293-304, 1994.

YU, X. J.; MCBRIDE, J. W.; DIAS, C. M.; WALKER, D. H. Molecular cloning and characterization of the 120-Kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-Kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 369-374, 2000.

YU, X. J.; MCBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Genetic diversity of the 28-Kilodalton outer membrane protein gene in human isolates of *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1137-1143, 1999.

ZHANG, X. F.; ZHANG, J. Z.; LONG, S. W.; RUBLE, R. P.; YU, X. J. Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 1021-1026, 2003.