



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**
CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE CAXIAS



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS - CESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE - PPGBAS**

CAROLINE KELLY COSTA ARAGÃO

**ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* (Rickettsiales:
Anaplasmataceae) EM CÃES E CARRAPATOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS,
MARANHÃO, BRASIL**

Caxias - MA
2016

CAROLINE KELLY COSTA ARAGÃO

ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) EM CÃES E CARRAPATOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS, MARANHÃO, BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientadora Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira.

Co-orientadora: Dra. Arannadia Barbosa Silva.

Caxias - MA
2016

A659e Aragão, Caroline Kelly Costa

Estudo sorológico e molecular de Ehrlichia canis (Rickettsiales: anaplasmataceae) em cães e carrapatos no município de Caxias, Maranhão, Brasil / Caroline Kelly Costa Aragão. __Caxias-MA: CESC/UEMA, 2016.

70f.

Orientador: Prof^a. Rita de Maria Seabra Nogueira

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias/UEMA, Curso de Mestrado em Biodiversidade, Meio Ambiente e Saúde.

1. Ehrlichia canis. 2. Imunofluorescência indireta – Reação. 3. Polimerase – Cadeia - Reação. I. Aragão, Caroline Kelly Costa. II. Título.

CDU 636.7:619.993(812.1)

CAROLINE KELLY COSTA ARAGÃO

ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) EM CÃES E CARRAPATOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS, MARANHÃO, BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira

Co-orientadora: Arannadia Barbosa Silva.

Aprovada em 30/08/2016

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



Dr. Francisco Borges Costa (Membro)
Universidade de São Paulo – USP
Bolsista FAPESP



Profa. Dra. Joseneide Teixeira Câmara (Membro)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Carmem e Aragão,
Fonte de todo amor e compreensão.*

EPÍGRAFE

“Quem elegeu a busca, não pode recusar a travessia.”

Guimarães Rosa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força em todos os momentos e bênçãos concedidas.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) assim como ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde (PPGBAS) pela valiosa formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão do edital de financiamento do presente projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pós graduação.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), especialmente ao prof. Gilberto Gazêta e a profa. Marinete Amorim, do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN), pelos estágios e parceria que foram de extrema importância na realização do trabalho e no meu aperfeiçoamento profissional.

À profa. Maria Claudene Barros, pelo apoio e acondicionamento de amostras no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL).

À profa. Rita de Maria Seabra Nogueira, pelo incentivo à pesquisa, confiança e orientação.

Aos meus pais, Carmem e Aragão, que desde minha mais tenra idade, quando comecei a demonstrar interesse pela natureza e por assuntos relacionados à mesma, investiram e ainda investem na minha educação. Ao meu irmão Júlio que sempre torceu por mim. Vocês são o meu maior tesouro. E espero, retribuir em dobro tudo que até hoje gentilmente fizeram por mim.

À família Ribeiro, especialmente à Dona Irani, que me acolheu nesse último ano e que tem sido como uma segunda mãe. Obrigada pelo apoio, incentivo e compreensão. Não posso deixar de mencionar, a minha irmã de coração, Rosa Christina que compartilha comigo todos os momentos felizes e difíceis de um início de vida acadêmica. Com você aprendi o significado de amizade e respeito. Que nossa amizade perdure por muitos anos.

À Arannadia Barbosa, pela paciência, co-orientação e por todo conhecimento que me foi repassado com tanto esmero. Ao Diego Montenegro, pelo precioso auxílio estatístico neste trabalho. À Juliana Bezerra pelo apoio nas correções. Serei eternamente grata. Aos amigos que ajudaram nas coletas: Débora Pereira, Edén Pereira, Giovani de Abreu Junior e Sâmara Costa. Aos amigos que durante os estágios no LIRN, me ajudaram direta ou indiretamente: Karen Medeiros, Tayra Sayto, Rebecca Caetano, Karla Bitencourth, Bia Gois, Ademar Ferreira, Leonardo Moerbeck, Pablo Lemos, Glício (coisa de Luxo).

As amigas de turma do mestrado, Walna Pires, Gizelia Porto (equipe bala) e Raiana Cristina. Com vocês pude compartilhar momentos únicos de estudos, idas ao campo, momentos de lazer, alegrias. Meu agradecimento especial ao amigo Marcelo Ventura, por preciosos conselhos e ajuda em vários momentos da minha vida. Aos demais amigos que fizeram parte dessa jornada: Domingos Lukas, Elizete Castro, Geniana Reis, Maria Neta e Paulo Sergio. Obrigada pelo apoio e troca de conhecimentos.

Muito Obrigada a todos!

RESUMO

A erliquiose monocítica canina é causada por *Ehrlichia canis*, uma espécie de riquetsia gram-negativa da família Anaplasmataceae. Os objetivos desse estudo foram avaliar a ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães e carrapatos naturalmente infectados, em domicílios no município de Caxias, no Estado do Maranhão; Quantificar a taxa de infestação de carrapatos nos cães; Determinar a soroprevalência de *Ehrlichia* spp. em cães no ambiente urbano e rural; Detectar a presença de *Ehrlichia* spp. em cães e carrapatos por técnica molecular. Foram coletadas amostras de sangue de 103 cães sendo os mesmos provenientes de residências localizadas no município e 1.473 carrapatos. Dentre os animais analisados, 53 (51,4%) mostraram reatividade ao antígeno de *E. canis* pela RIFI e 10 (9,7%) amostras apresentaram resultado positivo pela PCR para *E. canis*. Para PCR dos carrapatos, foram processados 534 espécimes para pesquisa do gene *dsb* e dessas 25 (4,6%) espécimes de *R. sanguineus* foram positivos. As variáveis bairro/localidade e infestação por carrapatos foram estatisticamente significativas quanto à infecção por *E. canis*. Através da ferramenta BLASTn, as sequências obtidas neste estudo foram comparadas e mostraram identidade de 96% a 100% em relação à outras sequências de *E. canis* disponíveis no Genbank™. A reconstrução filogenética gerou uma árvore com topologia resultando na formação de dois clados bem definidos. A topologia da árvore filogenética apresentou dois clados bem definidos. O primeiro clado (96% de *bootstrap*) foi formado por amostras caracterizadas como *Ehrlichia* sp. com o protótipos de *Ehrlichia canis* (DQ460716|Jaboticabal) e *Ehrlichia canis* (CP000107.1|Strain. Jake). O segundo clado (98% de *bootstrap*) formou-se com os protótipos de *Ehrlichia canis* (KR732922.1| CR1 Costa Rica; AF403710.1|Estados Unidos; GU586135.1|Uberlândia; KR732921.1| CR2 Costa Rica). A frequência de cães sororreativos foi maior nos animais da zona rural do município estudado; O sequenciamento do fragmento da PCR amplificado, baseada no gene *dsb* confirmou pela primeira vez a detecção de *E. canis* em amostras de sangue e carrapatos obtidos de cães do município de Caxias-MA

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*. Reação de Imunofluorescência Indireta. Reação em Cadeia pela Polimerase.

ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis is caused by *Ehrlichia canis*, a species of gram-negative rickettsia of Anaplasmataceae family. The objectives of this study were to evaluate the occurrence of *Ehrlichia canis* in dogs naturally infected ticks and in households in the city of Caxias, in the state of Maranhão; Quantifying the tick infestation rate in dogs ; To determine the seroprevalence of *Ehrlichia* spp . in dogs in the urban and rural environment; To detect the presence of *Ehrlichia* spp . and ticks in dogs by molecular techniques. 103 blood samples of dogs were collected from households located in the municipality and 1,473 ticks. Among the animals studied, 53 (51.4%) showed reactivity to *E. canis* antigen by IFAT and 10 (9.7%) samples were positive by PCR for *E. canis*. For PCR of ticks were processed 534 specimens for research of *dsb* gene and of these 25 (4.6%) specimens of *R. sanguineus* were positive. Variables neighborhood/locality and tick infestation were statistically significant as to infection by *E. canis*. Through BLASTn tool, the sequences obtained in this study were compared and showed identity of 96% to 100% in relation to the other *E. canis* sequences available in GenBank™. Phylogenetic reconstruction generated a tree with topology resulting in the formation of two well-defined clades. The topology of the phylogenetic tree showed two well defined clades. The first clade (96% of *bootstrap*) was formed by samples characterized as *Ehrlichia* sp. with *Ehrlichia canis* prototypes (DQ460716|Jaboticabal) and *Ehrlichia canis* (CP000107.1|Strain Jake.). The second clade (98% of *bootstrap*) formed with *Ehrlichia canis* prototypes (KR732922.1|CR1 Costa Rica; AF403710.1|United States; GU586135.1|Uberlândia; KR732921.1|CR2 Costa Rica). The frequency of seroreactive dogs was higher in animals of the rural municipality studied; The sequencing of the amplified PCR fragment, based on gene *dsb* confirmed for the first time the detection of *E. canis* in blood samples and ticks obtained from dogs in the city of Caxias-MA

Keywords: *Ehrlichia canis*. Indirect Immunofluorescence. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE SIGLAS

°C - Graus Celsius.

µL – Microlitro.

ANOVA – Análise de Variância.

BLASTn – do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*.

CESC - Centro de Estudos Superiores de Caxias.

CP₁ – Controle Positivo um.

CP₂ – Controle positivo dois.

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

DNTP – Desoxirribonucleotídeo.

Dsb – Tio dissulfóxido oxiredutase.

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético.

EMC – Erliquiose Monocítica Canina.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz.

GEPLAN - Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico.

GL – Gelado.

H₂O – Água.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

ICC - Isolamento de cultura de células.

IFAT – do inglês, Indirect immunofluorescence.

IgG - Imunoglobulina G.

Km² – Quilômetro quadrado.

LIRN - Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses.

LSD - do inglês, *Fisher's Least Significant Difference*.

mA – Miliampere.

MgCL₂ - Cloreto de magnésio.

mL – Mililitro.

mm – Milímetro.

mM – Milimolar.

NaCl – Cloreto de sódio.

NCBI –do inglês, National Center for Biotechnology Information.

N₂ – Nitrogênio líquido.

Pb – Pares de base.

PCR - Reação em cadeia da polimerase.

pH - Potencial Hidrogeniônico.

PM – Peso molecular.

RNA - Ácido ribonucleico.

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta.

Rpm – Rotações por minuto.

RPT01A- PDTIS - Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA.

S – Segundos.

SAA - Setor de Apreensão Animal.

SDS - Sulfato Dodecil de Sódio.

SJPA - Sociedade Juiz forense de Proteção aos Animais.

SRD – Sem Raça Definida.

TAE - Tris-Acetato-EDTA.

Taq - *Thermus aquaticus*.

UV - Ultra-violeta.

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão.

UFMT – Universidade Federal do Mato Grosso.

V – Volume.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização da área de estudo do município de Caxias, Maranhão. Em destaque, os bairros e localidades onde foram feitas as coletas de amostras (sangue e carrapato).....	25
Figura 2. Delineamento experimental das amostras de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	30
Figura 3. Frequência de cães sororreativos (RIFI) relacionados por bairros/localidades, sexo e faixa etária.....	34
Figura 4. Frequência de cães positivos (PCR) relacionados por bairros/localidades, sexo e faixa etária.....	35
Figura 5. Árvore filogenética gerada pelo método Neighbor-Joining (NJ) agrupamento de vizinhos pelo programa Mega 6.0.....	39

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Ocorrência de <i>E. canis</i> segundo métodos sorológicos e moleculares, relatadas em estudos nacionais.	18
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das amostras de cães (n=103) domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	31
Tabela 2. Distribuição por espécie de carrapatos identificados em cães da zona urbana e rural domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	32
Tabela 3. Análise de variância para infestação de <i>R. sanguineus</i> em cães da zona urbana e rural domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	32
Tabela 4. Análise de variância para resultados da Imunofluorescência Indireta (RIFI) de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	33
Tabela 5. Análise de variância para resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	35
Tabela 6. Resultados da RIFI e PCR das amostras de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	36
Tabela 7. Distribuição de amostras positivas e negativas (RIFI e PCR) dos cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.....	36
Tabela 8. Análise da similaridade das sequências do estudo com protótipos representantes de <i>E. canis</i> relacionados ao gene dsb com seus respectivos números de acesso do GenBank™..	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. METODOLOGIA	24
3.1 Área de estudo	24
3.2 Coleta do Material	25
4. PROCESSAMENTO DO MATERIAL	26
4.1 Análise sorológica	26
4.2 Análise Molecular	26
4.2.1 Extração de DNA Genômico (DNAg)	26
4.2.2 Reação para amplificação de <i>E. canis</i>	27
4.2.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose	27
4.2.4 Sequenciamento	28
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6. RESULTADOS	31
6.1 Variáveis e número amostral de cães	31
6.2 Carrapatos	31
6.3 Diagnóstico sorológico (RIFI)	32
6.4 Diagnóstico molecular (PCR)	34
6.5 Resultados (RIFI/PCR) positivos e negativos para <i>E. canis</i>	36
6.7 Análise filogenética	39
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÕES	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	66
Anexo 1-Ficha clínica	67
Anexo 2-Termo de Autorização	68
Anexo 3-Protocolo de extração de DNA com NaCl	69
Anexo 4-PCR de amostras sanguíneas, usando iniciadores genéricos Dsb-330/Dsb-728 para <i>E. canis</i> . Poços 1,15,16 e 18 – Amostras positivas. PM=Peso molecular; CP1=Controle positivo1; CP2=Controle positivo2.	70
Anexo 5- PCR de carrapatos, usando iniciadores genéricos Dsb-330/Dsb-728 para <i>E. canis</i> . Poços 2,4,6,8,10,14,22,23 – Amostras positivas. PM=Peso molecular; CP1=Controle positivo1.	70

1. INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis foi primeiramente descrita como *Rickettsia canis* por Donatien e Lestoquard em 1935 na Argélia, associado à casos agudos de febre e anemia em diversos cães, sendo posteriormente reclassificada como *Ehrlichia canis* em 1945 (MACHADO, 2004). No entanto, somente em 1963, a doença, denominada erliquiose monocítica canina (EMC), teve destaque mundial após surto em cães militares britânicos e americanos em Singapura e Vietnã (MAVROMATIS et al., 2006; HARRUS; WARNER, 2010). No Brasil, é considerado por muitos, como um dos principais patógenos transmitidos por carrapatos aos cães, devido a inexistência de vacinas, a grande quantidade do vetor e à crescente casuística ao longo dos anos (AGUIAR, 2006). O seu primeiro relato foi em Belo Horizonte, por Costa et al. (1973), e posteriormente em 1978, na cidade de Jaboticabal, São Paulo (KAVINSKI, 1988).

Atualmente, o gênero *Ehrlichia* compreende seis espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. minasensis* e *E. ruminantium*. Além destas, uma possível espécie de erliquia foi identificada no Japão, tendo sido isolada a partir do carrapato *Ixodes ovatus*, e denominada como *E. oie* (SHIBATA et al., 2000; DUMLER et al., 2001; D'AGNONE et al., 2003; AGUIAR, 2006; BORIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2016).

São caracterizadas três formas para *E. canis*, que representam estágios de desenvolvimento de vida do parasita: a) mórulas, estruturas circundadas por uma membrana que contém quantidade variável de corpúsculos elementares (DAVOUST, 1993), descrita como colônia arredondada, com grânulos que se apresentam como corpúsculos elementares corados em azul escuro nos preparados corados pelo Giemsa; b) os corpúsculos elementares, organismos únicos que se apresentam aderidos à membrana plasmática da célula, a qual se invagina para dentro da célula (GREENE; HARVEY, 1984), através de endocitose, um processo mediado por receptores protéicos sobre a superfície da célula (MESSICK; RIKIHISA, 1993); c) a forma granular, corpúsculos iniciais, é composta de múltiplos grânulos. Estes grânulos precisam ser diferenciados das granulações azurófilas, que podem ocorrer no citoplasma de mononucleares sanguíneos de cães sadios. Os corpúsculos iniciais, inclusões pleomórficas, são formados a partir do crescimento e multiplicação dos corpúsculos elementares dentro do fagossoma, através da divisão binária, entre o 3º e 5º dia de infecção (NYINDO et al., 1971).

A transmissão da bactéria ocorre de forma mecânica, sendo transmitida através da saliva do carrapato vetor, pela picada destes durante o repasto sanguíneo, e estes se infectam ao se alimentarem de um hospedeiro infectado pela ingestão de leucócitos infectados de cães na fase aguda da doença, e se disseminam pelo organismo do carrapato através dos hemócitos do

intestino, indo para a glândula salivar (ADRIANZÉN et al., 2003). Após a penetração no hospedeiro canino, a primeira replicação das erlíquias ocorre nas células mononucleares e nos linfócitos. O hemoparasita penetra na membrana celular através de fagocitose e, uma vez dentro da célula hospedeira, inibe a formação do fagolisossoma, desenvolvendo-se dentro deste. A princípio, no interior de monócitos e neutrófilos são observados corpúsculos elementares iniciais com 0,5 a 1µm, que depois se multiplicam por divisão binária formando uma inclusão que recebe o nome de mórula, e que mede um a dois micras de diâmetro. Quando maduras, as mórulas se dissociam em novos corpúsculos elementares, que deixam as células por exocitose ou por lise das mesmas, seguindo para parasitar novas células (MENDONÇA et al., 2005; PEREIRA, 2006).

A erliquiose monocítica canina (EMC) é causada por *E. canis*, uma espécie de riquetsia gram-negativa da família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2007). Mundialmente, *E. canis* é transmitida pelo carrapato, *Rhipicephalus sanguineus* (NICHOLSON et al., 2010; HARRUS; WANER, 2011). É caracterizada por infectar os monócitos dos cães, podendo afetar também macrófagos e formam aglomerados intracitoplasmáticos, chamados de mórulas (AGUIAR, 2006; TAYLOR et al., 2007; GREENE, 2012). Estas mórulas compreendem um conjunto de microrganismos firmemente envoltos por uma membrana. As células infectadas se distribuem pelo organismo através da circulação do sangue e pelas vias linfáticas (DUMLER et al., 2001; ADRIANZÉN et al., 2003).

Carrapatos da família Ixodidae possuem altas taxas de reprodução e podem ser transportados por longas distâncias através de seus hospedeiros. De forma geral em áreas urbanas, *R. sanguineus* é o principal carrapato de cães (SHAW et al., 2001). Porém, em áreas rurais, diferentes espécies do gênero *Amblyomma* eventualmente infestam cães que têm acesso a áreas de matas e florestas podendo apresentar infestações mistas (LABRUNA et al., 2000). Dessa forma, os carrapatos são particularmente importantes não só porque os cães são animais domésticos e de companhia, mas também, devido a sua distribuição cosmopolita e pelo fato de circularem irrestritamente carregando carrapatos e patógenos para ambientes preservados (SZABÓ et al., 2010).

No Brasil, a infecção por *E. canis* está veiculada ao seu vetor, o carrapato *R. sanguineus*, de distribuição cosmopolita e que se encontra disseminado por toda área urbana e periurbana do Brasil (LABRUNA; PEREIRA., 2001), inclusive no estado do Maranhão (GUERRA; BRITO, 2004; COSTA et al., 2013). Devido à ampla distribuição geográfica de *R. sanguineus*, a presença desse vetor no animal caracteriza importante fator de risco para ocorrência da doença (D'AGNONE et al., 2003; TRAPP et al., 2006).

O carrapato *R. sanguineus* apresenta três formas parasitárias dentro de seu ciclo de vida: larva, ninfa e adulto, este último é o único estágio com dimorfismo sexual. Cada estágio parasita o hospedeiro por alguns dias (três a sete dias para larvas e ninfas, cinco a 10 dias para fêmeas e mais de 15 dias para machos), quando se alimenta principalmente de sangue, mas também de linfa e restos tissulares da derme e/ou epiderme lesada por diversas enzimas proteolíticas secretadas pela saliva do carrapato (LABRUNA, 2004). No final do período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para fazer, no ambiente, a ecdise para o próximo estágio evolutivo, sendo ninfas e adultos, respectivamente. As fêmeas ingurgitadas, que foram fertilizadas pelos machos sobre o hospedeiro, se desprendem deste para fazerem a postura de ovos no ambiente. Cada fêmea pode colocar de 1.000 a 3.000 ovos, que após incubados por algumas semanas, darão origem às larvas. Os machos, que ficam sobre o hospedeiro por vários dias ou semanas, não ingurgitam ou não aumentam nitidamente de tamanho, mas podem acasalar e fertilizar várias fêmeas neste período (LABRUNA, 2004). Os carrapatos sobrevivem como adultos sem se alimentarem entre 155 a 568 dias, podendo transmitir a infecção por até 155 dias após se tornarem infectados (D'AGNONE, 2006).

A duração das fases de desenvolvimento em vida livre (ecdise, postura e incubação dos ovos) pode variar de poucas semanas a alguns meses, sendo inversamente proporcional à temperatura ambiente (LABRUNA, 2004). A viabilidade dessas formas de vida livre é influenciada principalmente pelas condições microclimáticas e latitude. Tais condições representam os principais fatores reguladores do ciclo biológico (especialmente umidade relativa) onde o carrapato ingurgitado se encontra para dar sequência ao ciclo. Não há estudos que evidenciem com clareza a duração de cada geração do *R. sanguineus* em condições naturais no Brasil (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Os cães parasitados pelo vetor *R. sanguineus* são mais propensos a infecção por *E. canis* (D'AGNONE et al., 2001; MOREIRA et al., 2003; COSTA JR et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; DANTAS-TORRES, 2008a; CESAR, 2008). Estudos apontaram que *R. sanguineus* é a espécie prevalente em cães de áreas urbanas. Isso se deve à disponibilidade de habitat e ao comportamento nidícola do carrapato, uma vez que esta espécie de carrapato tem por hábito penetrar em pequenos orifícios e superfícies de cimento e madeira (CESAR, 2008).

Cães em áreas endêmicas e aqueles que são transportados para estas regiões são susceptíveis à erliquiose. Canídeos selvagens podem atuar como reservatórios da *E. canis*, tendo sido demonstrada infecção natural e/ou presença de anticorpos em chacal (*Lycaon pictus*), e experimental em um coiote, com *E. canis* (ALMOSNY, 2002), gatos domésticos (OLIVEIRA et al., 2009; ALMOSNY, 1998), gatos selvagens em cativeiro (ANDRÉ et al., 2010) e puma de

vida livre (FILONI et al., 2006). Recentemente foi relatada a ocorrência de infecção por *E. canis* em primatas do gênero *Callithrix* (MAFRA et al., 2015).

Estudos epidemiológicos constataram que a soroprevalência de *E. canis* em várias regiões do Brasil variou de 0,7% a 86,2%, dependendo do estudo da população, área geográfica e teste de diagnóstico utilizado (VIEIRA et al. , 2013a). A prevalência de *E. canis* em diferentes regiões do Brasil estão sumarizados no Quadro 1.

Quadro 1. Ocorrência de *E. canis* segundo métodos sorológicos e moleculares, relatadas em estudos nacionais.

Sorologia			
Referência/ano	Prevalência	Método	Local do estudo
CARLOS et al. (2007)	36%	RIFI	Bahia
COSTA Jr et al. (2007)	44,7%	RIFI	Minas Gerais
RISTOW et al. (2009)	54,9%	RIFI	Minas Gerais
SOUZA et al. (2010)	35,6%	RIFI	Bahia
SILVA et al. (2010)	42,5%	RIFI	Mato Grosso
KRAWCZAK et al. (2012)	4,4%	RIFI	Rio Grande do Sul
COSTA et al. (2015)	14,6%	RIFI	Maranhão
Biologia Molecular			
Referência/ano	Prevalência	Método	Local do estudo
D'AGNONE et al. (2003)	21,7%	PCR	Paraná
BULLA et al. (2004)	30,9%	PCR	São Paulo
MACIEIRA et al. (2005)	26,8%	PCR	Rio de Janeiro
RAMOS et al. (2010)	38%	PCR	Pernambuco
SOUSA et al. (2010)	15%	PCR	Mato Grosso
SOUZA et al. (2010)	34,5%	nested-PCR	Bahia
COSTA et al. (2015)	2,8%	PCR	Maranhão
ROTONDANO et al. (2015)	25%	PCR	Paraíba
MAKINO et al. (2016)	76,3%	PCR	Mato Grosso

Em zona rural, poucos estudos têm sido realizados e a epidemiologia da erliquiose é pouco conhecida. D'agnone et al. (2002) observaram que cães que habitavam área urbana periférica ou rural tinham maiores riscos de infecção por *E. canis*. De acordo com Rodriguez-Vivas et al. (2005) e Carlos et al. (2007), o ambiente rural propicia maior risco de infecção, pois a situação socioeconômica dificulta o controle do vetor e os cães são facilmente infestados por carrapatos. Em áreas rurais dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, foi observada uma prevalência de 4,8 e 5,94%, respectivamente, por meio de esfregaços sanguíneos (RODRIGUES

et al., 2004). Porém, essa prevalência provavelmente está subestimada, já que poucos cães com infecção aguda de *E. canis* apresentam mórulas em esfregaços sanguíneos (WOODY; HOSKINS, 1991). Aguiar et al. (2007), no município de Monte Negro, estado de Rondônia encontraram a prevalência de 24,8% (40/161) cães da área rural. Vieira et al. (2013b) no estudo realizado em assentamento do Sul do Brasil, verificou que 42,4% (56/132) eram cães soropositivos para *E. canis*.

Apesar de sua ampla distribuição em áreas urbanas e suburbanas, o carrapato *R. sanguineus* pode ocorrer em áreas rurais. Algumas formas de criação de cães (construção de canis) propiciam condições favoráveis e o estabelecimento do *R. sanguineus* nessas áreas (CESAR, 2008). Um estudo realizado com 450 cães de rua da cidade de Porto Alegre, Paraná, para a *R. sanguineus* indicou prevalência de 93,2% com taxas de infestação média de 24 carrapatos por cão (RIBEIRO et al., 1997). Rodrigues et al. (2001), analisou em áreas semiurbanas da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, a prevalência de carrapatos em cães recolhidos por diferentes instituições. A espécie *R. sanguineus*, foi a mais prevalente em cães de duas instituições avaliadas: no Setor de Apreensão Animal (SAA) 63,3% (38/60) e na Sociedade Juiz forense de Proteção aos Animais (SJPA) 56,8%(25/44). Ainda na cidade de Juiz de Fora, Soares et al. (2006) verificaram maior prevalência do carrapato *R. sanguineus* em cães que habitavam casas 35% (68/196) em relação aos cães residentes em apartamentos.

Souza et al. (2010), constataram através da *nested*-PCR dos carrapatos (*R. sanguineus*) a ocorrência de 21,9% (7/32) infectados por *E. canis*. Almeida et al. (2012) relatou que dos carrapatos *R. sanguineus* coletados em seu estudo, 29,6% (81/274) amplificaram DNA de agentes erliquiais, onde 38 (17,9%) amplificaram para *E. canis*. No entanto, Araes-Santos et al. (2015) relataram que a infecção por *E. canis* foi encontrada em apenas 4,9% (14/285) dos carrapatos *R. sanguineus* s.l, submetidos à PCR.

Os fatores epidemiológicos relacionados as condições climáticas, distribuição do vetor, população sob estudo, comportamento animal e habitat, assim como a metodologia empregada na investigação do agente podem afetar os níveis de prevalência da erliquiose canina o Brasil. (D'AGNONE et al., 2001).

A erliquiose monocítica canina (EMC) é causada por *E. canis*, uma espécie de riquetsia gram-negativa da família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2007). Mundialmente, *E. canis* é transmitida pelo carrapato, *Rhipicephalus sanguineus* (NICHOLSON et al., 2010; HARRUS; WANER, 2011). É caracterizada por infectar os monócitos dos cães, podendo afetar também macrófagos e formam aglomerados intracitoplasmáticos, chamados de mórulas (AGUIAR, 2006; TAYLOR et al., 2007; GREENE, 2012). Estas mórulas compreendem um conjunto de

microrganismos firmemente envoltos por uma membrana. As células infectadas se distribuem pelo organismo através da circulação do sangue e pelas vias linfáticas (DUMLER et al., 2001; ADRIANZÉN et al., 2003).

A EMC apresenta as fases aguda, sub-aguda e crônica, segundo os sinais clínicos. Cada fase possui algumas características próprias, mas muitas vezes é difícil diferenciá-las na rotina veterinária. A intensidade dos sinais (perda de peso, presença de petéquias e secreções nasais e oculares) varia com a cepa infectante, a resposta imune do animal, a alimentação e se há ou não infecções concomitantes de outros agentes (GREENE, 2012; ISOLA et al., 2012).

O período de incubação geralmente é de 8 a 20 dias, nos quais o microrganismo se multiplica por fissão binária no sistema fagocítico mononuclear, formando as mórulas. Como a bactéria se divide em vacúolos protegidos da ação dos lisossomos da célula, consegue desta forma se disseminar pelo organismo, alojando-se principalmente no fígado, baço e linfonodos, infectando outras células com a ruptura da membrana celular após a formação de um estágio mais tardio da mórula. Em seguida, tem início a fase aguda, que dura de 1 a 4 semanas. Com o tratamento adequado prescrito pelo médico veterinário, o animal pode se recuperar normalmente. Se não tratado, ou tratado de forma inadequada, começa o estágio subclínico da doença, no qual há recuperação clínica do paciente, que passa a aparentar estar saudável, apesar de continuar sendo um carreador de *E. canis*. Nessa fase, a contagem de plaquetas continua abaixo dos valores de referência (D'AGNONE, 2001; HIRSH et al., 2003; TAYLOR et al., 2007; GREENE, 2012; ISOLA et al., 2012).

A prevenção deve ser feita principalmente através do controle de carrapatos. Logo, o conhecimento da ixodofauna que ocorre em uma determinada região, é de suma importância para determinar quais patógenos transmitidos por carrapatos e determinar a competência vetorial dos carrapatos para determinados bioagentes (OYAFUSO et al., 2002). Segundo Labruna (2004), o controle químico de *R. sanguineus* pode ser realizado diretamente no hospedeiro, ou seja, no cão que apresenta parasitismo, onde estaria cerca de 5% dos carrapatos em um determinado instante. Porém, o autor menciona que o alvo maior do tratamento carrapaticida deve ser realizado diretamente no ambiente, pois os 95% da população encontra-se em toda área que o cão transita, incluindo o interior de residências, quintais e canis (LABRUNA, 2004).

As fêmeas ingurgitadas se desprendem dos cães, e por apresentar geotropismo negativo, deve-se priorizar a medida de controle nas paredes e teto do ambiente onde o cão vive. Mesmo dentro de uma casinha, as paredes e o teto são sempre os locais onde são encontrados em maior número os carrapatos em vida livre, ao passo que o assoalho é um local raramente utilizado pelos carrapatos para as fases de postura e ecdise. Diante dessas informações, pode-se dizer que a

aplicação de carrapaticidas no assoalho da casinha terá pouco ou nenhum efeito na população de carrapatos, ao passo que uma devida aplicação nas paredes internas, externas e teto pode garantir um controle adequado, notadamente quando o cão passa grande parte da noite no interior da casinha (LABRUNA, 2004). Há evidências de que a grande maioria das larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* se desprendem do hospedeiro durante à noite (PAZ et al., 2001). Portanto, as áreas onde o cão passa durante à noite devem ser priorizadas num programa de tratamentos ambientais com carrapaticidas (LABRUNA, 2004).

A EMC apresenta sinais clínicos inespecíficos e que podem levar a demora do tratamento ou a um diagnóstico errôneo. O diagnóstico da infecção inclui a visualização microscópica de mórulas, cultivo, sorologia e a PCR. A Detecção de mórulas de *E. canis* é incomum, nas fases subclínica e crônica da infecção (HIBBLER et al., 1986), sendo difícil a visualização mesmo em amostras sorologicamente positivas (OLIVEIRA et al., 2000).

Alternativamente, o uso de isolamento de cultura de células (ICC) para detecção de *E. canis* em sangue de cães infectados tem se mostrado a forma mais sensível e específica (IQBAL et al., 1994). No entanto, o isolamento é trabalhoso e pouco prático em laboratórios de microscopia clínica, o ICC leva de 1 a 4 semanas para obter resultados, limitando assim a sua utilidade com uma ferramenta de diagnóstico rápido. Este requer uma técnica de cultura de células e instalações adequadas, além de seu alto custo (IQBAL et al., 1994).

A técnica sorológica mais utilizada para o diagnóstico da *E. canis* é a imunofluorescência indireta (RIFI), onde os anticorpos do tipo IgG são detectados e indica exposição a bactéria (RISTIC, 1972). A mesma é capaz de detectar anticorpos anti-*E. canis* no sétimo dia pós-infecção (CESAR, 2008). É uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e triagem, sendo que a RIFI é considerada padrão ouro sorológico, indicando exposição à *E. canis* (HARRUS; WARNER, 2011). Entretanto, estes testes podem indicar apenas exposição prévia ao microrganismo. Após o tratamento, os títulos de anticorpos diminuem gradualmente, desse modo, o animal torna-se negativo entre 15 a 30 meses. Em áreas que apresentam endemismo de erliquiose, pode ocorrer um aumento considerável de falsos-positivos devido ao alto título de IgG para *E. canis* nos cães que não demonstram sinais clínicos (PERILLE; MATUS, 1991; BULLA et al., 2004; RIKIHISA, 1991; WOODY; HOSKINS, 1991; WANER et al., 2001).

A PCR é um ensaio altamente específico, especialmente quando utilizado em conjunto com o teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico da erliquiose canina (HARRUS et al., 1998). A PCR é um teste que tem a capacidade de detectar baixa parasitemia e se um cão soropositivo é portador ou não, visto que, a sorologia pode manter-se positiva mesmo em animais livres de parasito (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1998). Neste

sentido, a utilização de técnicas de biologia molecular também possibilita a diferenciação das espécies dentro do gênero *Ehrlichia*, pela presença de sequências específicas no DNA (CESAR, 2008).

O gene *dsb* codifica a proteína responsável pelas ligações dissulfídicas das bactérias. Apesar disso, tem a sequência de DNA bastante polimórfica, entre as diferentes espécies, sendo útil para ensaios moleculares de alta especificidade. A amplificação do gene *dsb*, utilizando os iniciadores (Dsb-330 e 728) detectam somente espécies do gênero *Ehrlichia*, ainda que realizada em uma única reação de amplificação (DOYLE et al., 2005). Segundo Aguiar (2006), o fragmento do gene *dsb* obtido pela amplificação por PCR, demonstrou completa conservação entre as amostras estudadas de *E. canis*, em contraste com as outras espécies de *Ehrlichia*, o qual variou de 74% a 81%. Mesmo assim, o gene possui regiões de ácido nucleico, suficientemente heterólogas, que permite ser utilizado como alvo específico para PCR de *E. canis* (CHIARI, 2010).

O estudo dos aspectos epidemiológicos dos patógenos, especialmente daqueles com potencial zoonótico, como é o caso de *E. canis*, permite antever situações de risco para a população humana e animal. Assim, a erliquiose tem sido motivo de grande interesse para pesquisas em medicina veterinária e considera-se também seu possível impacto para saúde pública, pela possibilidade de acometimento humano. Os cães são hospedeiros primários do carrapato *R. sanguineus*, vetor de *E. canis* e embora incomum, pode parasitar o homem, aliado ao fato do estrito contato entre os cães, seus proprietários e conseqüentemente seus ectoparasitos.

Nos últimos anos, vários estudos relacionados a erliquiose tem sido realizados no Brasil. Porém, no estado do Maranhão os dados são ainda incipientes e restritos a uma só microrregião. O município de Caxias, não apresenta dados epidemiológicos quanto à referida doença. O presente estudo representa o primeiro relato de ocorrência da bactéria no município. É válido mencionar que as condições morfoclimáticas favorecem o ciclo biológico do *R. sanguineus* e por sua vez, a circulação da bactéria no ambiente. As medidas de prevenção devem ser mais incisivas nos ambientes em que as condições socioeconômicas são mais precárias, devido à intensa infestação de carrapatos em cães que não passam por um controle carrapaticida eficiente e/ou frequente. É de extrema importância a realização de mais estudos, envolvendo técnicas sorológicas e moleculares no Maranhão, pois permitirá inferir sobre a prevalência de *E. canis* e sua dinâmica como patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães e carrapatos naturalmente infectados, em domicílios no município de Caxias, no Estado do Maranhão.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a taxa de infestação de carrapatos nos cães;
- Determinar a soroprevalência de *Ehrlichia* spp. em cães no ambiente urbano e rural;
- Detectar a presença de *Ehrlichia* spp. em cães e carrapatos por técnica molecular.

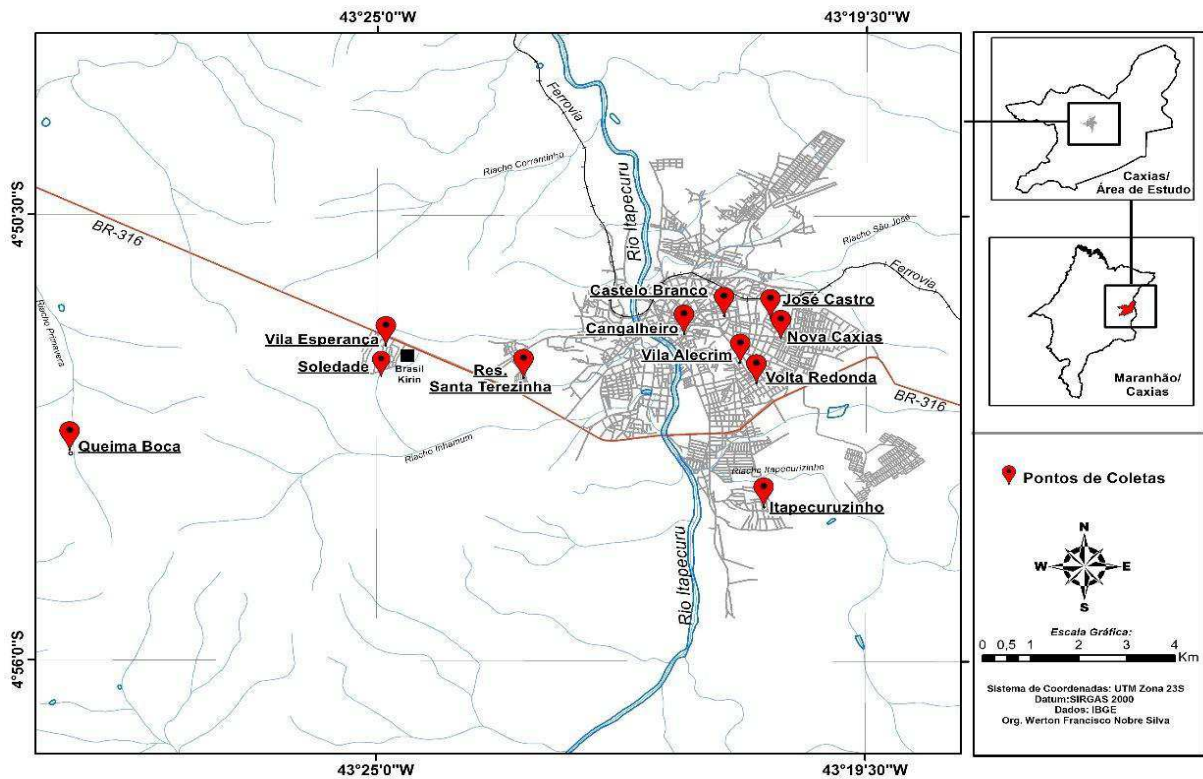
3. METODOLOGIA

3.1 Área de estudo

As amostras foram coletadas de cães no município de Caxias, localizado na parte leste do Maranhão, situada entre as coordenadas a 04°51'32"S e 43°21'22"W. Possui área de 5.150,667 km² com população estimada de 159.396 habitantes (IBGE, 2013). O clima da cidade é predominantemente tropical, muito quente e sub-úmido, com dois períodos definidos, chuvoso (janeiro a junho) e seco (julho a dezembro). Este município caracteriza-se por apresentar cobertura vegetal típica da zona dos cocais, sendo transição entre a Floresta Amazônica e o Cerrado. A temperatura média varia entre 26,1°C, no período chuvoso, a 35,6°C, no período seco. A média anual de umidade relativa do ar é de 70%, a máxima ocorre nos meses de março e abril, com valor de 83%, enquanto no período seco o valor pode chegar a 57%. A precipitação média anual é de 1.454,6 mm (GEPLAN, 2002).

As coletas (amostras sanguíneas e carrapatos) foram realizadas em 11 pontos da cidade. A zona urbana do município é formada por 35 bairros, segundo a lei 1.838/2009. O critério de escolha dos bairros foi por sorteio e devido à disponibilidade da equipe veterinária. Um total de seis bairros foram amostrados (Cangalheiro, Castelo Branco, Vila Alecrim, Volta Redonda, Nova Caxias, José Castro) do perímetro urbano e as cinco localidades (Localidades semi urbanas: Itapecuruzinho e Santa Terezinha; Localidades rurais: Soledade, Vila Esperança e Queima Boca) intencionalmente escolhidas pela proximidade de áreas de proteção ambiental (Figura 1).

Figura 1. Caracterização da área de estudo do município de Caxias, Maranhão. Em destaque, os bairros e localidades onde foram feitas as coletas de amostras (sangue e carrapato).



Fonte: Adaptado e editado a partir de imagens de satélite fornecidas pelos sites, Google imagens e Google Earth (5 de julho de 2016).

3.2 Coleta do Material

Foram coletadas amostras de sangue de cães sendo provenientes de residências localizadas no município de Caxias, nos meses de Janeiro, Fevereiro, Maio, Julho e Agosto de 2015. As coletas ocorreram nesses meses devido à disponibilidade da equipe de médicos veterinários. As amostras foram coletadas aleatoriamente independentemente da idade, sexo, raça ou sinais clínicos. Cada animal teve uma ficha individual com os seguintes dados: histórico clínico, presença ou ausência de ectoparasitos, e o termo de autorização assinado pelos proprietários (Anexos 1 e 2).

As amostras de sangue foram coletadas da veia cefálica utilizando seringas 10 ml, sendo que metade do sangue total (6 ml) foi acondicionada em tubos contendo o anticoagulante ácido etileno diamino tetracético (EDTA) para realização da técnica de PCR e a outra parte transferida para tubos sem EDTA para realização da RIFI.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). As amostras de sangue e o soro foram aliquotadas em microtubos de 1,5 mL Dnase e Rnase free, duplicados, identificados, e armazenado em temperatura de - 20°C nas dependências do laboratório de Genética e Biologia Molecular da Instituição acima referida.

Os cães amostrados foram inspecionados quanto à presença de carrapatos. Os espécimes foram coletados manualmente e identificados utilizando a chave de Aragão e Fonseca (1961) e a chave pictórica de chave Barros-Battesti et al. (2006).

4.PROCESSAMENTO DO MATERIAL

4.1 Análise sorológica

A sorologia para *E. canis* foi realizada através da pesquisa de anticorpos IgG anti-*E. canis*, por meio da RIFI utilizando-se o kit para diagnóstico *in vitro* de Erliquiose canina, Imunodot® diagnósticos, seguindo o protocolo do fabricante. As lâminas de *E. canis* compreendem um conjunto de poços contendo macrófagos canino fixados (Linhagem DH82). Como controle positivo foi utilizado soro canino reagente e como controle negativo soro canino não reagente (provenientes no kit). Foi realizada uma triagem na diluição 1:64.

4.2 Análise Molecular

4.2.1 Extração de DNA Genômico (DNAg)

As amostras sanguíneas coletadas foram submetidas à extração de DNAg, utilizando-se o Kit QIAmp DNA blood mini kit, Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante. O DNAg extraído foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

Os espécimes de carrapatos identificados foram submetidos à extração de DNAg através da técnica de extração por sal (ALJANABI; MARTINEZ, 1997), seguindo a rotina do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses – LIRN/FIOCRUZ. O DNAg extraído foi armazenado a -20°C até a realização dos ensaios (Anexo 3).

4.2.2 Reação para amplificação de *E. canis*

As alíquotas de DNAg das amostras sanguíneas e dos carrapatos foram submetidas à ensaios de PCR através de oligonucleotídeos (primers) Dsb-330 5-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3) e Dsb-728 5-CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCTTAA AGT-3 (DOYLE et al., 2005) com o objetivo de obter a amplificação de um fragmento de 409-bp para o gene *dsb*, foi realizada a reação de PCR contendo: 1X de solução tampão com pH 8,5 (Promega); 1,5 mM de MgCl₂ (Promega); 0,2 mM de cada nucleotídeo (DNTPs); 0,4 μM de cada iniciador (primer); 0,5 U de Taq DNA polimerase (GoTaq G2 Hot Start Polymerase – Promega). O volume restante foi completado com água DNase/ RNase free para 25μl. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 50 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos (LABRUNA et al., 2007; SOUSA, 2012).

A amplificação do fragmento gênico ocorreu em um termociclador automático GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). Controles positivos (DNA de *E. canis*) e negativos (água Dnase/ Rnase free) foram incluídos em todos os ensaios de PCR. Mediante o risco em potencial de contaminação, cada etapa, tais como extração de DNA, PCR e eletroforese, foi realizada em salas separadas.

4.2.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (Invitrogen®) (0,5 μL/mL) em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb Ludwig Biotec®). Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta bio-Imaging Systems (MiniBIS Pro®) acoplado a um computador. (SOUSA, 2012).

4.2.4 Sequenciamento

Após a detecção do fragmento amplificado no tamanho esperado na PCR, estes foram purificados utilizando *Nucleospin gel and PCR Clean-up Kit* (Macherey-nagel, Duren, Germany) e posteriormente submetidos ao sequenciamento de DNA. O processo de precipitação e a reação de sequenciamento foram realizados pela Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA - RPT01A- PDTIS/FIOCRUZ. Os amplicons foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores aplicados na reação de PCR, em um sequenciador automático ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo previamente descrito por Otto et al. (2008).

As sequências obtidas para o gene *dsb* foram editadas no programa ChromasPro 1.5 (*Technelysium*, Queensland, Australia), e alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 1994) disponível no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente. Posteriormente, as sequências foram identificadas através de busca no BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) do National Center for Biotechnology Information-NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

As reconstruções filogenéticas foram realizadas por *Neighbor Joining* utilizando o modelo evolutivo Kimura-dois-parâmetros, com 1000 repetições de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) e exclusão dos *gaps* através do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados do presente estudo foi realizada com base na associação das seguintes variáveis biológicas e dependentes: Infestação dos cães por *R. sanguineus*, infecção natural dos carrapatos por *E. canis*, a ocorrência de cães soropositivos (anticorpos IgG anti-*E. canis*) pela RIFI e cães positivos (infecção ativa) por *E. canis* pela PCR. Os cães soropositivos diagnosticados pela RIFI, indicam que os animais foram expostos em algum momento à bactéria, o que configura uma infecção tardia. Porém, os cães com a presença de DNA de *E. canis* diagnosticados pela PCR, apresentaram-se com infecção corrente e/ou ativa para a referida bactéria, ou seja, expuseram agentes erliquiais nas amostras sanguíneas. Para fins de associação dos critérios anteriores foram empregadas as variáveis preditoras ou independentes: idade absoluta de cães, classes de idade <2 anos, 2-4 anos e >4 anos e sexo dos

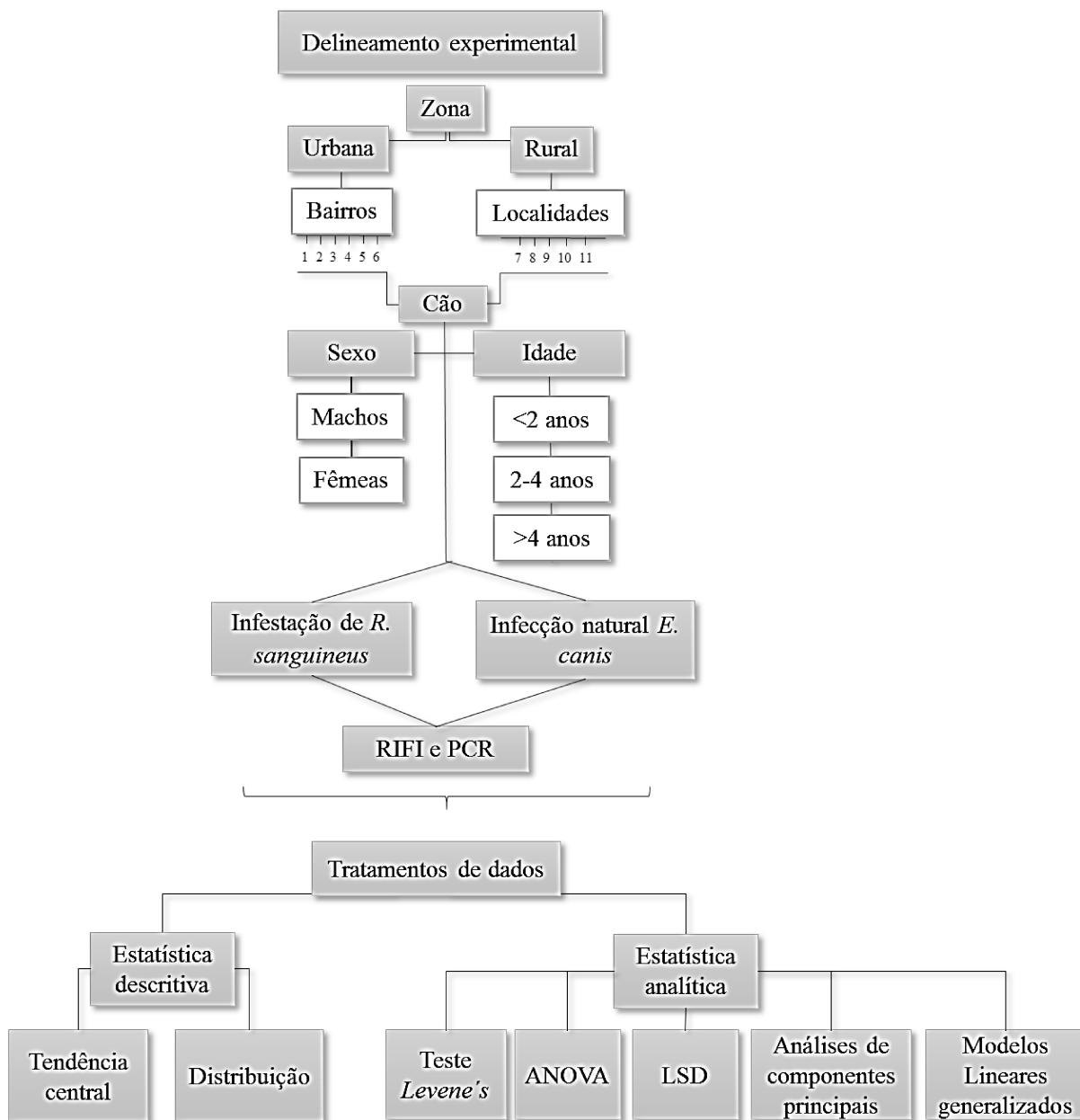
cães, além dos fatores zona (urbana ou rural) e bairro/localidade. As perguntas de pesquisas analisadas através da estatística foram:

1. A infestação de cães por carrapatos é heterogênea (Riqueza e abundância de espécies) entre área rural e urbana? Para isso foram empregadas as medidas de tendência central e distribuição de frequências das espécies de carrapatos infestando os cães em bairros e localidades da zona urbana e rural.

2. Pelo menos um dos fatores independentes influencia a taxa de infestação e número de indivíduos de *R. sanguineus* em cães? Inicialmente foi empregada análise de componentes de variância para identificar os fatores que mais contribuíram na variabilidade da taxa de infestação. O teste de *Levene's* foi aplicado para provar a homocedasticidade dos dados. Posteriormente foi empregada ANOVA simples para identificar associação entre as variáveis priorizadas e a variável resposta. Para corroborar o resultado das análises, também foi feita ANOVA multifatorial usando como variável resposta, a taxa de infestação e como fatores principais a classe de idade, sexo e como covariáveis a zona e bairro/localidade (Figura 2).

3. A soropositividade e identificação ativa de infecção de cães por *E. canis* está associado a pelo menos um ou combinação de fatores independentes e com a taxa de infestação por *R. sanguineus*? A associação foi avaliada por meio de análises de Modelos Lineares Generalizados, sendo as variáveis respostas qualitativas (RIFI e PCR) e as independentes quali-quantitativas (taxa de infestação, bairro/localidade, classe de idade e sexo). Foi utilizado também gráficos de dispersão para os resultados sorológicos e moleculares, bem como o testes *post-hoc*, método de Fisher de Menor Diferença Significante (do inglês, *Fisher's Least Significant Difference - LSD*), para identificar os fatores que causam efeito estatísticos significantes nas variáveis dependentes (Figura 2). Em todas análises, considerou-se o valor de $p \leq 0,05$ estatisticamente significativo, com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statgraphics® Centurion XVI (STATPOINT TECHNOLOGIES, 2006).

Figura 2. Delineamento experimental das amostras de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.



6. RESULTADOS

6.1 Variáveis e número amostral de cães

A população total desse estudo foi composta por 103 cães, sendo 49 (47,6%) provenientes da zona urbana e 54 (52,4%) da zona rural. Quanto ao sexo, o número de fêmeas foram 52 (50,4%) e machos foram 51 (49,6%). Todos os cães eram sem raça definida (SRD). A faixa etária com maior expressão foi a de cães com menos de dois anos dos quais 24 (52%) eram da zona urbana e 23 (48%) da zona rural. A infestação por carrapatos foi observada em 79 cães, onde destes 43 (54,4%) eram da zona urbana e 36 (45,6%) eram provenientes da zona rural (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização das amostras de cães (n=103) domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

Variáveis	Número de indivíduos		Total N (%)
	Zona urbana N (%)	Zona rural N (%)	
Bairros/localidades	49 (47,6)	54 (52,4)	103 (100)
Sexo	Machos	28 (54,9)	51 (49,5)
	Fêmeas	21 (40,4)	52 (50,5)
Faixa etária	< 2 anos	24 (52)	47 (45,6)
	2- 4anos	16 (44,4)	36 (34,9)
	> 4 anos	9 (45)	20 (19,5)
Infestação de carrapatos	Sim	43(54,4)	79 (76,6)
	Não	6 (25)	24 (23,4)

6.2 Carrapatos

Um de total 1.473 espécimes de carrapatos foi coletado, sendo que, 1.134 (77%) foram coletados de cães da zona urbana e 339 (23%) em cães da zona rural. A espécie com maior representatividade, foi *R. sanguineus*, com 1.465 espécimes (99,4%), seguido por seis espécimes de *Amblyomma* spp, um indivíduo de *Amblyomma cajennense* s.l e um de *Amblyomma dubitatum* (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição por espécie de carrapatos identificados em cães da zona urbana e rural domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

Espécie /Estádio	Zona urbana				Total	Zona rural				Total
	F (%)	M (%)	N (%)	L (%)		F (%)	M (%)	N (%)	L (%)	
<i>R. sanguineus</i>	317 (27,9)	398 (35,1)	405 (35,7)	14 (1,24)	1134	124 (37,4)	186 (56,1)	21 (6,3)	0	331
<i>Amblyomma</i> spp	0	0	0	0	0	2 (40)	1 (10)	3 (50)	0	6
<i>A. cajennense</i>	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0	1
<i>A. dubitatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)	0	1

F= fêmeas; M= machos; N= ninfas; L= larvas.

A taxa de infestação canina por *R. sanguineus* está maiormente influenciada pela variável classe de idade (81,8%) em comparação com as outras variáveis (Tabela 3). Porém, não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre a média de infestação de *R. sanguineus* nos diferentes níveis do fator classe de idade ($F_{(2;63)}=0,35$; $P=0,70$; teste *Levene's*=0,72).

Tabela 3. Análise de variância para infestação de *R. sanguineus* em cães da zona urbana e rural domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

Variáveis	Soma de quadrados	GI*	Quadrado médio	Componentes variáveis	Porcentagem
Zona	97,3877	1	97,3877	0,0	0,00
Bairro	2067,54	9	229,726	14,7636	10,85
Sexo	1552,59	11	141,145	9,91369	7,29
Classes de idade	4901,75	44	111,403	111,403	81,87
Total (corrigido)	8619,26	65			

*Graus de liberdade.

6.3 Diagnóstico sorológico (RIFI)

Dos 103 soros de cães testados, 53 (51,4%) mostraram reatividade ao antígeno de *E. canis* pela RIFI. Do total de cães sororreativos, 18 (33,9%) eram provenientes de zona urbana e 35 (66,1%) da zona rural; destes 28 (52,8%) eram machos e 25 (47,2%) fêmeas. Quanto às classes de idade; 23 (43,3%) cães eram menores de dois anos, seguido por 20 (37,7%) na faixa etária de dois à quatro anos e 10 (19%) maiores de quatro anos.

Inicialmente, através do modelo estatístico linear generalizado foi possível observar que há uma relação estatisticamente significativa entre o número de cães sororreativos e os cinco fatores preditores ($F_{(15;50)}=2,53$; $P=0,007$; $IC=95\%$). Segundo a ordem que foram introduzidas as cinco variáveis preditoras no modelo estatístico, se identificou que a frequência de cães sororreativos está influenciada estatisticamente pelos fatores bairro/localidade e pela taxa de infestação de *R. sanguineus* (Tabela 4).

As variáveis (bairro e infestação de *R. sanguineus*) explicam o percentual de 43,19% da variabilidade em cães sororreativos e que a ordem em que foram inseridas as variáveis no modelo, não influenciaram o resultado encontrado ou não houve evidência estatística de auto correlação entre as variáveis no ordem que foram inseridas ($R^2=43,19$; R^2 ajustado= 26,15%; Durbin-Watson=2,342 ($P=0,564$)).

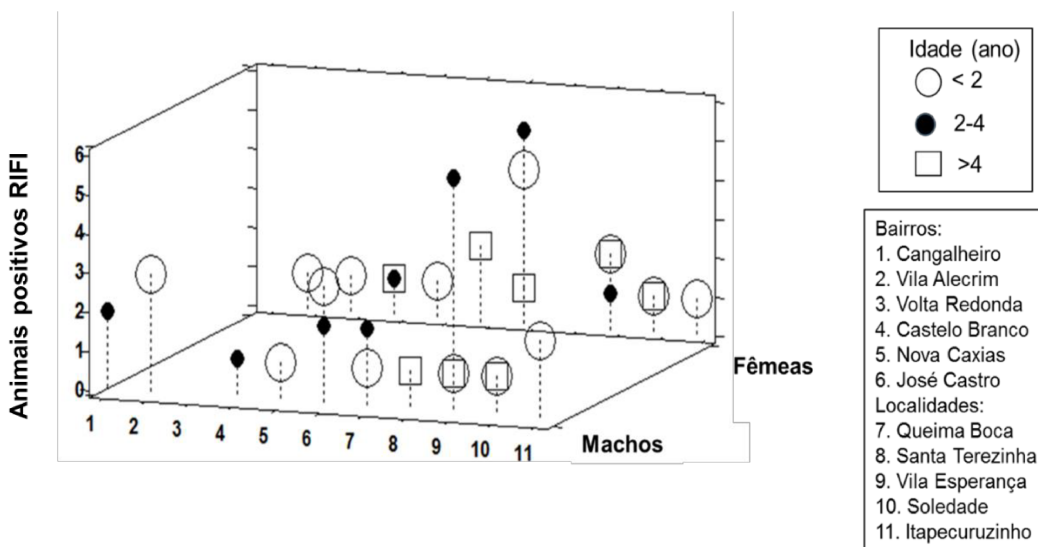
Tabela 4. Análise de variância para resultados da Imunofluorescência Indireta (RIFI) de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

Variáveis	Soma de quadrados	Gl*	Quadrado médio	Razão-F	P -valor
Bairro/localidade	29,9762	10	2,99762	2,68	0,0104
Classes de idade	3,4104	2	1,7052	1,52	0,2277
Sexo	0,0837533	1	0,0837533	0,07	0,7855
Infestação	4,32136	1	4,32136	3,86	0,0549
Infecção carrapato	1,15735	1	1,15735	1,03	0,3139
Resíduos	55,9227	50	1,11845		
Total (corrigido)	98,4394	65			

*Graus de liberdade.

A frequência de cães sororreativos foi maior nas localidades oito (Santa Terezinha) e nove (Vila Esperança) apresentando 13 cães, respectivamente. Na localidade Santa Terezinha foi observada a ocorrência de um macho com idade superior à quatro anos e 12 fêmeas (cinco menores de dois anos; seis na faixa etária de dois à quatro anos e uma cadela com idade superior à quatro anos). Na localidade Vila Esperança a estratificação foi de oito machos (um menor de dois anos; seis na faixa etária de dois à quatro anos; um com idade superior à quatro anos) e cinco fêmeas (duas menores de dois anos; uma na faixa etária de dois à quatro anos; duas com idade superior à quatro anos) (Figura 3).

Figura 3. Frequência de cães sororreativos (RIFI) relacionados por bairros/localidades, sexo e faixa etária.



6.4 Diagnóstico molecular (PCR)

Das 103 amostras sanguíneas analisadas pela PCR, foram encontrados fragmentos amplificados do gene *dsb* em 10 (9,7%) amostras, enquanto que em 93 (90,3%) amostras não foi detectado a presença deste fragmento gênico (Anexo 4). Quanto aos pontos de coleta, três (30%) dos cães positivos eram oriundos da zona urbana e sete (70%) da zona rural; destes cinco (50%) eram machos e cinco (50%) fêmeas. Quanto às classes de idade; dois (20%) cães eram menores de dois anos, seguido por cinco (50%) na faixa etária de dois à quatro anos e três (30%) maiores de quatro anos.

Para PCR dos carrapatos, foram processados 534 espécimes para pesquisa do gene *dsb* e dessas 25 (4,6%) espécimes de *R. sanguineus* foram positivos (Anexo 5). Entre os carrapatos positivos, 23 eram adultos (13 machos e 11 fêmeas), 1 ninfa e um pool com 10 larvas.

Através do modelo estatístico linear generalizado foi possível observar que há uma relação estatisticamente significativa entre o número de cães positivos e os cinco fatores preditores ($F_{(15;50)}=2,84$; $P=0,002$; $IC=95\%$). Conforme a ordem que foram introduzidas as cinco variáveis preditoras no modelo estatístico, identificou-se que a frequência de cães infectados por *Ehrlichia* está correlacionada estatisticamente pelos fatores bairro e pela taxa de infestação de *R. sanguineus* (Tabela 5). O percentual de 46,01% da variabilidade em cães com infecção ativa e a ordem em que foram inseridas as variáveis no modelo, não influenciaram o resultado obtido ou

não houve evidência estatística de auto correlação entre as variáveis ordem que foram inseridas ($R^2=46,01$; R^2 ajustado= 29,83%; Durbin-Watson=2,613 (($P=0,906$)).

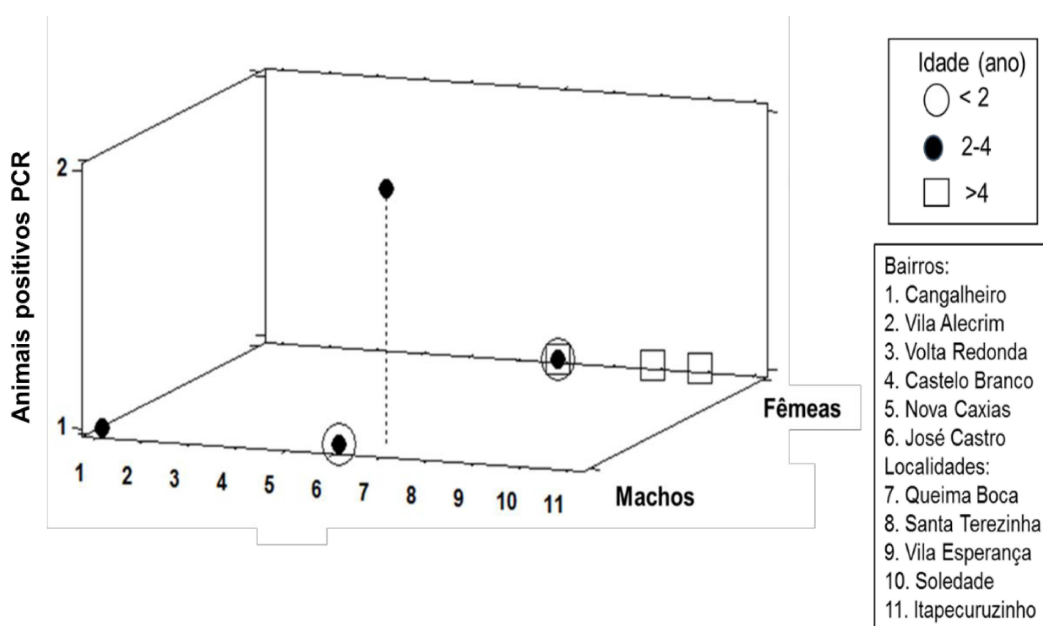
Tabela 5. Análise de variância para resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

Variáveis	Soma de quadrados	Gl *	Quadrado médio	Razão-F	P-valor
Bairro/localidade	3,52711	10	0,352711	3,12	0,0037
Classes de idade	0,198077	2	0,0990386	0,87	0,4232
Sexo	0,0178435	1	0,0178435	0,16	0,693
Infestação	0,780186	1	0,780186	6,89	0,0115
Infecção carrapato	3,01605E-05	1	3,01605E-05	0	0,987
Resíduos	5,66005	50	0,113201		
Total (corrigido)	10,4848	65			

*Graus de liberdade.

A frequência de cães com infecção ativa foi maior no bairro seis (José Castro) com cinco cães. Foi observada a ocorrência de dois machos (um menor de dois anos e um indivíduo na faixa etária de dois à quatro anos) e três fêmeas (uma menor de dois anos; uma na faixa etária de dois à quatro anos; uma com idade superior à quatro anos (Figura 4).

Figura 4. Frequência de cães positivos (PCR) relacionados por bairros/localidades, sexo e faixa etária



6.5 Resultados (RIFI/PCR) positivos e negativos para *E. canis*

Dos 53 soros reagentes, seis amostras de soro foram positivas e 47 amostras negativas pela PCR para *E. canis*. Entre os 50 soros não reagentes, quatro animais foram positivos e 46 negativos pela PCR (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da RIFI e PCR das amostras de cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

	Cães positivos na PCR <i>E. canis</i>	Cães negativos na PCR <i>E. canis</i>	Total
Cães sororeagentes <i>E. canis</i>	6	47	53
Cães não-sororeagentes <i>E. canis</i>	4	46	50
Total	10	93	103

A frequência de cães que apresentaram nas duas metodologias resultados positivos foi maior na zona rural em relação a zona urbana. A tabela 7 mostra que a localidade Queima Boca teve três cães com anticorpos anti-*E. canis* e infecção ativa por *E. canis*. O cão 53 oriundo dessa localidade foi o único portador de amostras de soro, sangue e carrapato positivos para *E. canis*. Os demais bairros e localidade tiveram casos únicos de animais positivos para os métodos de diagnóstico abordados no estudo (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição de amostras positivas e negativas (RIFI e PCR) dos cães domiciliados no município de Caxias, Maranhão.

Identificação	RIFI	PCR	PCR	Zona	Bairro/localidade
	Soro canino	Sangue canino	Carrapato		
Cão 2	+	+	-	Urbana	Cangalheiro
Cão 53	+	+	+	Urbana	José Castro
Cão 57	+	+	-	Rural	Queima Boca
Cão 61	+	+	-	Rural	Queima Boca
Cão 76	+	+	-	Rural	Queima Boca
Cão 103	+	+	-	Rural	Soledade

Das 10 amostras sanguíneas, foi amplificado e sequenciado um fragmento de 409 pb do gene *dsb*; quatro (40%) sequências foram caracterizadas como *E. canis*, sendo as mesmas provenientes da zona rural. Quanto ao sexo, dois (50%) eram machos e dois (50%) fêmeas com a distribuição de um indivíduo por classe de idade (<2anos, 2-4 anos, >4 anos) em ambos os sexos. Dos 25 espécimes de *R. sanguineus* positivos, duas (8%) sequências foram identificadas com a presença do gene *dsb*.

As sequências caracterizadas indicaram alto grau de identidade com as sequências disponíveis no GenBank™ com uma variação de 96% a 100%. Quanto à cobertura observou-se que a variação foi de 96 a 97% (Tabela 8).

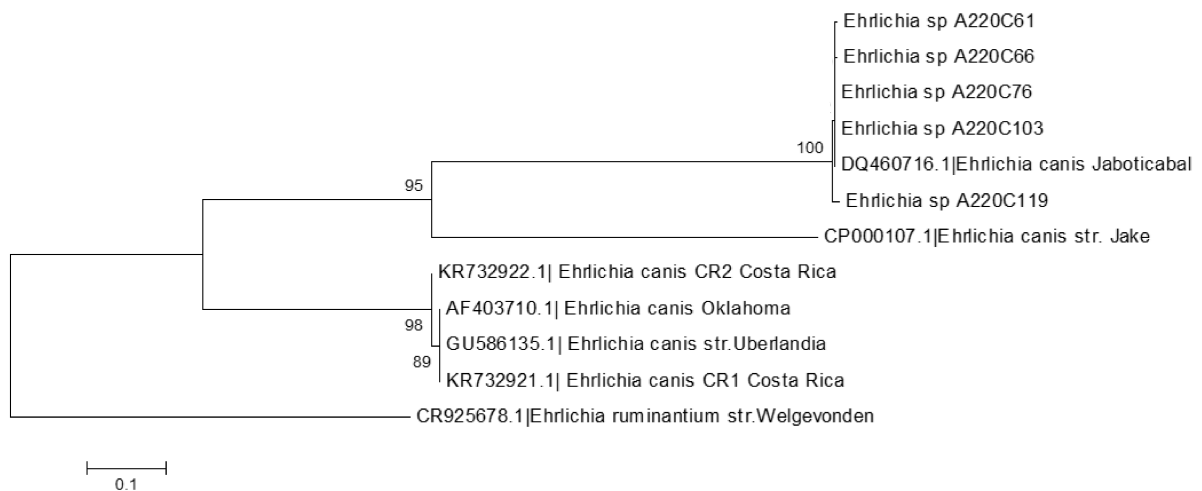
Tabela 8. Análise da similaridade das sequências do estudo com protótipos representantes de *E. canis* relacionados ao gene *dsb* com seus respectivos números de acesso do GenBank™.

Sequências do estudo	% identidade	% cobertura	Número de acesso/ GenBank	Espécie
Cão 61 Amostra sanguínea	98%	97%	CP000107.1	<i>E. canis</i> (str. Jake/Estados Unidos)
	98%	97%	AF403710.1	<i>E. canis</i> (Oklahoma/Estados Unidos)
	98%	97%	KR732921.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	98%	97%	GU586135.1	<i>E. canis</i> (str.Uberlândia/Brasil)
	98%	97%	KR732922.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
Cão 66 Amostra sanguínea	97%	97%	CP000107.1	<i>E. canis</i> (str. Jake/Estados Unidos)
	97%	97%	AF403710.1	<i>E. canis</i> (Oklahoma/Estados Unidos)
	97%	97%	KR732921.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	97%	97%	GU586135.1	<i>E. canis</i> (str.Uberlândia/Brasil)
	96%	97%	KR732922.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
Cão 76 Amostra sanguínea	97%	97%	CP000107.1	<i>E. canis</i> (str. Jake/Estados Unidos)
	97%	97%	AF407310.1	<i>E. canis</i> (Oklahoma/Estados Unidos)
	97%	97%	KR732921.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	97%	97%	KR732922.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	97%	97%	GU586135.1	<i>E. canis</i> (str.Uberlândia/Brasil)
Cão 103 Amostra sanguínea	99%	97%	CP000107.1	<i>E. canis</i> (str. Jake/Estados Unidos)
	99%	97%	AF403710.1	<i>E. canis</i> (Oklahoma/Estados Unidos)
	99%	97%	KR732921.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	99%	97%	GU586135.1	<i>E. canis</i> (str.Uberlândia/Brasil)
	99%	97%	KR732922.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
Cão 34 Carrapato	100%	97%	CP000107.1	<i>E. canis</i> (str. Jake/Estados Unidos)
	100%	97%	AF403710.1	<i>E. canis</i> (Oklahoma/Estados Unidos)
	100%	97%	KR732921.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	100%	96%	GU586135.1	<i>E. canis</i> (str.Uberlândia/Brasil)
	100%	97%	KR732922.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
Cão 53 Carrapato	100%	97%	CP000107.1	<i>E. canis</i> (str. Jake/Estados Unidos)
	100%	97%	AF403710.1	<i>E. canis</i> (Oklahoma/Estados Unidos)
	100%	97%	KR732921.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)
	100%	96%	GU586135.1	<i>E. canis</i> (str.Uberlândia/Brasil)
	99%	97%	KR732922.1	<i>E. canis</i> (Lagunilla/Costa Rica)

6.7 Análise filogenética

A topologia da árvore filogenética apresentou dois clados bem definidos. O primeiro *cluster* (95% de *bootstrap*) foi formado por cinco amostras caracterizadas como *Ehrlichia* sp. com o protótipos de *Ehrlichia canis* (DQ460716|Jaboticabal) e *Ehrlichia canis* (CP000107.1|Strain. Jake). O segundo clado (98% de *bootstrap*) formou-se com os protótipos de *Ehrlichia canis* (KR732922.1| CR1 Costa Rica; AF403710.1|Estados Unidos; GU586135.1|Uberlândia; KR732921.1| CR2 Costa Rica). Foi incorporada a análise o protótipo de *Ehrlichia ruminantium* (CR925678.1| Str. Welgevonden) como grupo externo. Foram sete sequências do estudo e sete sequências obtidas da base de dados do GenBank™ (Figura 5).

Figura 5. Árvore filogenética gerada pelo método Neighbor-Joining (NJ) agrupamento de vizinhos pelo programa Mega 6.0.



Foram cinco sequências do estudo e sete sequências obtidas da base de dados do GenBank™. Os números próximos aos ramos indicam os valores de *bootstrap*.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo relata a primeira detecção sorológica e molecular de *E. canis* em cães domésticos e carrapatos do município de Caxias, do Leste Maranhense. No total de animais avaliados (103) verificou-se que a proporção de cães machos na zona urbana foi maior (54,9%) em relação as fêmeas (40,4%). Canatto et al. (2012) observou em seu estudo a preferência dos proprietários por cães machos, pelo motivo de considerarem melhores na vigilância das residências. Outro motivo salientado é a dificuldade de se evitar a prenhez das fêmeas, tendo em vista que nem sempre esses animais permanecem retidos. Na zona rural ocorreu o inverso, sendo a quantidade de cadelas superior (59,6%) em relação aos machos (45,1%). Devido às condições em que esses cães são mantidos, o controle de natalidade torna-se difícil, uma vez que esses animais têm livre acesso às ruas e a outros animais errantes.

Os cães do estudo foram todos classificados como SRD (sem raça definida). Estudos indicam que não há predisposição racial quanto à infecção, porém os cães da raça Pastor Alemão apresentam maior gravidade clínica quando infectados (HARRUS et al., 1997; SOUSA, 2006; SILVA et al., 2010; SOUSA et al., 2010).

O parasitismo por carrapatos foi maior na zona urbana (43;54,4%) do que na zona rural (36; 45,6%). Observou-se que a espécie *R. sanguineus* foi a mais numerosa do estudo e a única identificada na zona urbana (99,4%; 1.465/1.473). Resultado próximo foi encontrado por Costa et al. (2013) no estudo realizado nas zonas urbanas e áreas rurais de Chapadinha e Imperatriz (78%; 1.235/1584). Rodrigues et al. (2001), na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, verificou que a taxa de infestação por *R. sanguineus* ficou em torno de 63,3%. Entretanto, o trabalho realizado por Ribeiro et al. (1997) na cidade de Porto Alegre, Paraná, encontrou um percentual mais elevado de carrapatos para esta mesma espécie (93,2%; 220/236). Costa et al. (2015) encontrou para a microrregião de Chapadinha, Maranhão, nas áreas urbanas o percentual de 37% (344/929) e nas zonas rurais de 59,8% (472/929) para a espécie *R. sanguineus*. Outros trabalhos realizados no Maranhão relataram infestações por esta espécie de carrapato (GUERRA; BRITO, 2004; COSTA et al., 2013).

O *R. sanguineus* é um carrapato que foi introduzido no Brasil com a colonização e tem estreita relação com o cão doméstico (SZABÓ et al., 2005). Como observado neste trabalho, esta espécie domina infestações em áreas urbanas, corroborando a literatura (RIBEIRO et al., 1997; SZABÓ et al., 2001; DANTAS- TORRES et al., 2004; LABRUNA et al., 2005; SOARES et al., 2006; SZABÓ et al., 2010). Isso se deve à disponibilidade de hábitat e ao comportamento nidícola

do carrapato, uma vez que, a espécie por hábito penetra em pequenos orifícios e superfícies de cimento e madeira (CÉSAR, 2008).

Os cães provenientes da zona rural do estudo apresentaram infestações mistas de carrapatos da espécie *R. sanguineus* bem como do gênero *Amblyomma* (*Amblyomma* spp. e *Amblyomma cajennense* s.l), sendo este achado o primeiro relato da ocorrência destas espécies para o município de Caxias (MA). Porém, outro estudo realizado no Maranhão por Costa et al. (2013) relatou a ocorrência de *A. cajennense* de 2.5% (39/1.584).

O encontro dessas espécies em cães se justifica segundo Szabó et al. (2001), pelo fato do cão coexistir em locais permissivos para o desenvolvimento destas espécies, ou se este se encontra em contato com outros animais, hospedeiros preferenciais, a infestação acontece. Sugere-se que os cães da zona rural que albergaram essas espécies do gênero *Amblyomma* entraram em contato com áreas endêmicas para as referidas espécies. Porém, parar testar esta hipótese é necessário a realização de mais estudos. O conhecimento da ixodofauna em áreas rurais, tendo em vista as doenças que eventualmente possam ser transmitidas pelos carrapatos, é um assunto pouco explorado em muitas regiões do Brasil e que deve ser aprofundado devido sua grande importância para a epidemiologia de carrapatos e doenças transmitidas por estes (MARTINS et al., 2009).

A análise de variância para a infestação de carrapatos da espécie *R. sanguineus* nos cães mostrou-se influenciada pelo fator classes de idade do que pelas outras variáveis, porém não houve significância estatística. Rotondano et al. (2015) observou em seu estudo com animais do município de Patos, Paraíba, que a média de *R. sanguineus* foram estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) entre os 100 cães positivos e negativos para *E. canis*. Outro estudo voltado para a avaliação de fatores de risco para infecção por *E. canis* realizado por Minervino et al. (2015), nas comunidades indígenas (Tapirapé e Karajá) do Mato Grosso, mostrou que as infestações por *R. Sanguineus* foram homogêneas nas comunidades e estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos cães jovens (\leq um ano de idade).

No presente trabalho, a frequência de anticorpos anti-*E. canis* encontrada foi de 51,4% (53/103). A ocorrência de sororreativos foi maior na faixa etária de cães menores de dois anos (23; 50%). Faienstein et al. (2008) no trabalho sobre ocorrência da EMC no município de Aracaju, Sergipe, observaram maior prevalência em cães jovens. Segundo Azevedo et al. (2011) o acometimento de reações sorológicas em animais jovens, principalmente com idade inferior a um ano, ocorre porque o sistema imunológico ainda está em formação, o que pode facilitar a infecção por *E. canis*. Todavia, Baneth et al. (1996) descreveu que a maior prevalência em cães adultos e idosos, se deve ao fato do maior tempo de exposição destes ao hospedeiro invertebrado.

Tanikawa et al. (2013) verificaram que dentro dos resultados sorológicos, houve maior frequência de positividade em cães mais velhos ($p < 0,05$).

Os animais da zona rural apresentaram-se mais reativos (35; 66,1%), embora tenha apresentado um percentual mais baixo de infestação por carrapatos. Este fato demonstra que possivelmente as condições ambientais, sobretudo o clima da região, propiciam a proliferação dos carrapatos e conseqüentemente a disseminação de *E. canis* nessa área. Segundo Soares et al. (2006), o ambiente de casa com quintal gera uma condição ecológica que favorece o parasitismo por *R. sanguineus* e de outras formas imaturas de ixodídeos. Costa-Jr et al. (2007) afirmam que os cães que vivem nas zonas rurais estão mais expostos a carrapatos vetores que aqueles que vivem em áreas urbanas. Neste mesmo trabalho os autores ainda mencionam que os cães que vivem em áreas urbanas são submetidos a mais tratamentos acaricidas periódicos do que os cães de zona rural, pois nestes raramente são usados acaricidas e sim se procede à catação. No entanto, no estudo de Costa et al. (2015) realizado na microrregião de Chapadinha, Maranhão, apenas 14,6% (47/322) dos cães apresentaram soros reagentes e 16,2% (28/173) eram provenientes da zona rural.

O estudo utilizou como ponto de corte 1:64. A diferença observada nas frequências de cães sororreativos entre os estudos pode ser atribuída, dentre outros fatores, a padronização da RIFI, principalmente no ponto de corte determinado por cada estudo (variando de 1:20 a 1:80), além da diversidade de modelos experimentais e protocolos de diagnóstico utilizados pelos autores, e fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da erliquiose nas regiões estudadas (Costa et al., 2015).

No estado da Bahia, o trabalho de Carlos et al. (2007) realizado em Ilhéus e Itabuna, o percentual foi mais baixo (36% ;72/200) em relação a frequência de soros reagentes para *E. canis* mencionada no presente estudo. O mesmo fato foi observado em outro estudo conduzido por Souza et al. (2010), onde a prevalência foi de 35,6% (168/472) para os cães na cidade de Salvador (distritos de Itapuã e Cajazeiras). No entanto, o estudo realizado no município de Patos, Estado da Paraíba, a frequência de anticorpos anti-*E. canis* foi de 72,5% (79/109) (Azevedo et al., 2011). Outro estudo realizado por Tanikawa et al. (2013) também no município de Patos, mostrou que a frequência de cães com anticorpos, foi de 69,4% (75/108). No mesmo município, o trabalho de Rotondano et al. (2015) constatou que 34% (34/100) dos animais analisados foram sororreativos para *E. canis*. Ainda no nordeste, o estudo de Araes-Santos et al. (2015) relatou a prevalência de 23% (116/504) de *E. canis* de amostras dos municípios de Petrolina e Juazeiro.

Em outras regiões do Brasil, vários trabalhos avaliaram a prevalência de *E. canis*. Oyafuso et al. (2002) encontraram uma prevalência de 23% em 71 cães na região Norte do

Paraná. Albernaz et al. (2007) avaliaram 1.576 cães oriundos da cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, e observaram prevalência de 13,9%. No Estado do Mato Grosso, na cidade de Cuiabá, 254 cães domiciliados foram selecionados e testados sorologicamente e foram detectados 108 (42,5%) positivos para *E. canis* (SILVA et al., 2010).

O trabalho feito por Krawczak et al. (2012) envolvendo 316 cães da região central do Estado do Rio Grande do Sul, mostrou que apenas 4,4% (14/316) dos animais apresentaram soros reagentes para *E. canis* de acordo com a RIFI, embora a infestação por carrapatos por *R. sanguineus* seja comum nesta região. O estudo de Vieira et al. (2013b), realizado em assentamento do Sul do Brasil, verificou que 42,4% (56/132) eram cães soropositivos. O trabalho realizado com cães nas comunidades indígenas de Tapirapé e Karajá, Mato Grosso, feito por Minervino et al. (2015) verificou que a prevalência de cães soropositivos foi de 14,3% (46/327). Krawczak et al. (2015) no estudo feito em uma região do Nordeste de Belo Horizonte, encontrou um percentual de 23,9% (23/96) de amostras com anticorpos anti-*E. canis*. Gottlieb et al. (2016) avaliaram cães no município Passo Fundo, Rio Grande do Sul. Nesse estudo foi encontrado um percentual de 5,1% (3/58) de animais que apresentaram sorologia positiva para *E. canis*.

Neste estudo observou-se que a frequência de cães com soros reagentes foi influenciada pelos fatores bairro/localidade e infestação de *R. sanguineus*, porém não houve evidência estatística de auto correlação entre essas variáveis. O estudo feito por Costa et al. (2013) observou diferença significativa quanto à média de infestação (*R. sanguineus*) para a microrregião de Imperatriz ($p = 0,05$). É válido mencionar que a frequência de anticorpos anti-*E. canis* é dependente da distribuição do vetor, *R. sanguineus* (TANIKAWA et al, 2013). Vieira et al. (2013a) não observaram diferença estatística entre a associação de cães soropositividade para *E. canis* e presença de carrapatos ($p > 0,05$). A presença de carrapatos nos cães também não foi associada estatisticamente a infecção por *E. canis* nos animais amostrados no estudo conduzido por Ueno et al. (2009). Possivelmente, a população canina do município de Caxias está altamente exposta à carrapatos *R. sanguineus* infectados por *E. canis*.

As localidades oito (Santa Terezinha) e nove (Vila esperança), da zona rural do município estudado, apresentaram as maiores frequências de cães sororreativos anti-*E. canis*, influenciando estatisticamente os resultados. Ueno et al. (2009) não observaram diferença significativa entre os cães com livre acesso à rua e/ou com acesso à zona rural, no estudo realizado na cidade de Cuiabá, Mato Grosso. No entanto, os animais das localidades do presente estudo tinham acesso à rua e podem estar mais expostos à infecção em decorrência de maior chance de contato com carrapatos infectados.

No trabalho de Araes-Santos et al. (2015) realizado em áreas urbanas e rurais do município de Petrolina, Pernambuco, os valores de soroprevalência foram maiores nas áreas rurais que nas áreas urbanas destes municípios, corroborando com os dados do presente estudo. Entretanto, não houve diferença estatística ($p > 0,05$). O mesmo fato foi apontado no trabalho de Minervino et al. (2015) pois nenhum fator de risco foi significativo para a soroprevalência de *E. canis* nas comunidades indígenas (Tapirapé e Karajá) do Mato Grosso.

Não foi observada predisposição racial (todos os cães SRD) e sexual quanto à infecção por *E. canis* no município em estudo. Resultados similares foram vistos nos trabalhos de Sousa (2006) e Silva et al. (2010). A taxa de infecção e classes de idade não apresentaram associação significativa, igualmente visto por Aguiar et al. (2007) e Silva et al. (2010). Os resultados também corroboraram com os de Vieira et al. (2013b) onde não houve associação significativa encontrada entre o sexo, presença de carrapatos e soropositividade para *E. canis*.

A frequência de positivos pela PCR foi de 9,7% (10/103) de soros caninos reagentes com ocorrência maior na faixa etária de dois a quatro anos (50%; 5/10). Aspecto discordante ao presente estudo, foi encontrado por Ueno et al. (2009) na avaliação de 70 cães atendidos no Hospital veterinário na cidade de Botucatu, São Paulo, sendo maior frequência (65%) constatada em cães com idade até 12 meses. Resultado similar, foi observado no estudo de Witter et al. (2013), dos 77 cães atendidos no Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), a frequência de animais positivos pela *nested*-PCR segundo a faixa etária (1 a 12 meses) foi de 33,3% (8/24).

O fato se justifica segundo os autores, pois cães nessa faixa etária estão mais susceptíveis a contraírem a infecção e apresentarem o agente circulante, decorrentes de alta infestação por carrapatos (*R. sanguineus*). Porém, no trabalho de Tanikawa et al. (2013) verificaram que na faixa etária de um a três anos, o número de cães positivos para *E. canis* foi maior (7,1%; 2/28). Como o método empregado foi baseado na pesquisa direta de *Ehrlichia* sp. a partir do sangue canino total, isto implica dizer que os cães positivos deste estudo provavelmente estavam em fase aguda da doença ou no processo de renovação parasitária que ocorre na fase crônica.

Os animais provenientes da zona rural foram mais infectados (70%) neste estudo. Entretanto no estudo realizado no Estado do Maranhão, Costa et al. (2015) verificaram que entre os nove cães (2,8%; 9/322) infectados por *E. canis*, quatro animais eram de áreas urbanas e cinco de áreas rurais. O trabalho de Santos et al. (2013) apresenta uma diferença sutil quanto à frequência de positivos por zonas. Segundo os autores, entre os positivos, 15,6% (25/160) eram da zona urbana e 14,4% (23/160) da zona rural. No entanto, Carlos et al. (2007) mencionou que

o ambiente rural, cuja situação socioeconômica dificulta o controle do vetor com os cães facilmente infestados por carrapatos, apresenta maior risco de infecção (RODRIGUEZ-VIVAS; ALBORNOZ; BOLIO, 2005), o que possivelmente explica o resultado observado no estudo.

Trabalhos epidemiológicos relacionados à detecção molecular de *E. canis* estão sendo realizados no Brasil. No Nordeste, o estudo de Ramos et al. (2010), realizado na cidade de Recife, Pernambuco, encontrou um percentual de 38% (78/205) para *E. canis*. No mesmo estado, Araes-Santos et al. (2015), realizaram um estudo no município de Petrolina e detectaram DNA de *E. canis* em apenas 8,3% (42/504) de amostras de sangue canino. No trabalho de Souza et al. (2010) realizado nos distritos de Cajazeiras e Itapuã, Bahia, as amostras de sangue dos animais soropositivos foram submetidas à pesquisa do DNA por *nested*-PCR. Dentre os positivos, 34,5% (58/168) cães tiveram PCR positivos para *E. canis*. No trabalho de Rotondano et al. (2015) entre os 100 animais analisados, do município de Patos localizado no Estado da Paraíba, 25% dos cães foram positivos para *E. canis* pela PCR.

Na região Centro-Oeste, o trabalho realizado em Cuiabá, Mato Grosso, por Sousa et al. (2010), avaliaram 195 cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMT e destes, uma amostragem de 60 animais foi escolhida aleatoriamente para serem avaliados por PCR e revelaram que 15% (9/60) eram positivos para *E. canis*.

A frequência de cães com infecção ativa por *E. canis* foi influenciada estatisticamente pelos fatores, bairro/localidade e infestação de *R. sanguineus*. A associação do parasitismo por *R. sanguineus* e o número de cães positivos foi observado também no trabalho de Carvalho et al. (2008) realizado com cães dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia ($p < 0,05$). No estudo de Tanikawa et al. (2013), os animais que permaneceram em ambientes sujos, apresentaram uma maior frequência de positividade na PCR ($p < 0,05$). No entanto, no estudo de Ueno et al. (2009) a presença de carrapatos não foi associada estatisticamente à infecção por *E. canis* nos animais amostrados. Apenas o bairro seis (José Castro) da zona urbana do município, apresentou maior frequência de cães com infecção ativa por *E. canis*. Segundo Dantas-Torres et al. (2010), ambientes carentes de controle vetorial, se tornam biótopos adequados para a manutenção de *R. sanguineus* favorecendo o contato destes com os cães.

Os fatores, classes de idade e sexo, não apresentaram diferenças significativas no estudo ($p > 0,05$). Este resultado corrobora com o trabalho de Carvalho et al. (2008) e Santos et al. (2013).

A prevalência de carrapatos *R. sanguineus* infectados por *E. canis* foi de 4,6% (25/534) no estudo. No entanto, Souza et al. (2010), constatou através da *nested*-PCR dos carrapatos (*R. sanguineus*) a ocorrência de 21,9% (7/32) infectados por *E. canis*. Almeida et al. (2012) relataram que dos carrapatos *R. sanguineus* coletados em seu estudo, 29,6% (81/274) amplificaram DNA

de agentes erliquiais, onde 38 (17.9%) amplificaram para *E. canis*. Percentual mais baixo, Araes-Santos et al. (2015) relatou que a infecção por *E. canis* foi encontrada em apenas 4,9% (14/285) dos carrapatos *R. sanguineus* submetidos à PCR. O que poderia justificar tal disparidade pode estar associada com fatores climáticos, como a diversidade geográfica e climática, além do método de diagnóstico aplicado (AKTAS et al., 2009).

Um estudo recente realizado no Brasil avaliou a competência vetorial de quatro populações de *R. sanguineus* de diferentes regiões geográficas (São Paulo/BSP; Rio Grande do Sul/BRS; Argentina/ARG; Uruguai/URU) para *E. canis* (MORAES-FILHO et al., 2015). No entanto, apenas a população BSP apresentou-se como vetor competente de *E. canis*, isto é, apenas os cães infestados com carrapatos adultos (população BSP) desenvolveram sinais clínicos, soroconversão bem como PCR positivo para *E. canis*. Os autores sugerem que a população de *R. sanguineus* que circula na região Sul do Brasil (BRS) não possui potencial de transmissão de *E. canis*, o que justificaria baixa prevalência de erliquiose na região do país.

Os resultados encontrados nas metodologias empregadas, evidenciou que entre as 10 amostras positivas pela PCR, seis amostras mostraram presença de anticorpos, indicando infecção com resposta humoral, enquanto as outras quatro amostras soronegativas, indicaram infecção aguda, onde ainda não podem apresentar anticorpos (ALMOSNY, 1998). No entanto, o estudo de Witter et al. (2013) todos os cães positivos pela PCR confirmaram-se positivos pela RIFI e segundo os autores, este fato demonstra infecção ativa de *E. canis*. Cães soropositivos, mas negativos pela PCR foram provavelmente infectados pelo agente (*E. canis*) e estes podem ou não evoluir para a fase crônica da doença (HARRUS, WANER, 2011). Entre os 50 cães com soros não reagentes do estudo, quatro amostras foram positivas e 46 negativas pela PCR. A detecção de *E. canis* apenas pela PCR, sugere fase aguda ou fase assintomática da doença, pois nesta última podem ocorrer ciclos de parasitemia do agente (WITTER et al., 2013).

No presente estudo, foi observado que o número de cães positivos para os dois métodos de diagnóstico (RIFI e PCR) concentrou na localidade Queima Boca, onde um cão apresentou reação sorológica e positividade pela PCR nas amostras de sangue e carrapato, fato que evidencia infecção ativa da bactéria na localidade.

As sequências das amostras sanguíneas positivas pela PCR, indicaram alto grau de identidade (96% a 100%) com as sequências de *E. canis* de diferentes áreas geográficas do Brasil e de outros países, disponíveis no GenBank™. Corroborando com os resultados deste estudo, o trabalho de Alves et al. (2014) avaliando cães do sudeste do Brasil, verificou que as sequências obtidas, agruparam com 100% de identidade, com a sequência de *E. canis* Str Jake (CP000107.1). Resultado igualmente visto por Cicuttin et al. (2016, no prelo) no trabalho realizado com

amostras de cães da área metropolitana de Buenos Aires, Argentina. O mesmo foi encontrado por Aguiar et al. (2013) no estudo envolvendo cães de várias regiões do Brasil, com 100% de identidade entre as amostras do estudo com a sequência (AF403710.1|Oklahoma) disponível no GenBank.

O trabalho de Braga et al. (2013), verificou que entre as amostras positivas, duas sequências de DNA (350 pb) foram idênticas (100%) as sequências de *E. canis* na base de dados GenBank (GU586135.1|Str.Uberlândia, DQ460716.1|Jaboticabal, CP000107.1| Str. Jake). Resultado semelhante foi observado no estudo de Santos et al. (2013) apresentando 100% de identidade com as sequências (AF403710.1|Oklahoma, CP000107.1|Str. Jake, DQ460716.1|Jaboticabal).

As sequências obtidas dos carrapatos revelaram também alto nível de identidade (100%) com as sequências (CP000107.1, AF403710.1, KR732921.1, GU586135.1 e KR732922.1). Melo et al. (2016), estudando cães domésticos do pantanal brasileiro, encontrou o grau de identidade (100%) de uma sequência de *R. sanguineus* com *E. canis* Uberlândia (GU586135.1). Resultado similar foi observado por Cicuttin et al (2015), entre as sequências do estudo com as sequências de *E. canis* do Brasil (Jaboticabal, Uberlândia e São Paulo; números de acesso GenBank: DQ460716.1, GU586135.1, DQ460715.1) e Estados Unidos (Str. Jake; GenBank accession número: AF403710.1)

A infecção em cães por *E. canis* já foi descrita em São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Bahia, Mato Grosso e em outros estados do Brasil (D'AGNONE et al., 2001; MOREIRA et al., 2003; BULLA et al., 2004; MACHADO, 2004; ALVES et al, 2005; MACIEIRA et al., 2005; AGUIAR et al., 2007a; LABRUNA et al, 2007; SANTOS et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; SOUSA et al., 2010). Entretanto, apesar da ampla ocorrência de *E. canis* descrita na literatura, estudos moleculares, sobretudo no estado do Maranhão, ainda são incipientes.

Nesse contexto, a reconstrução filogenética evidenciou que as sequências caracterizadas como *Ehrlichia* sp. do presente estudo são filogeneticamente mais próximas da espécie *E. canis* (DQ460716|Jaboticabal e CP000107.1|Str. Jake). O segundo clado foi constituído por sequências do GenBank™ (KR732922.1|Lagunilla-Costa Rica, AF403710.1|Oklahoma, GU586135.1|Uberlândia, KR732921.1|Lagunilla-Costa Rica) o que sugere monofiletismo da espécie devido alto índice de *bootstrap* (98%).

O estudo de André et al. (2012), quanto à análise filogenética baseada no gene *dsb*, posicionou o DNA de *Ehrlichia* sp encontrado em um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) no mesmo ramo que *E. canis* (DQ460716|Jaboticabal), com alto *bootstrap* (100%), corroborando

assim com os resultados vistos neste trabalho. 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 (DOYLE et al., 2005).

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os cães do município de Caxias apresentaram parasitismo por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*;
- *R. sanguineus* foi a espécie mais frequente no presente estudo;
- Os cães domiciliados em áreas urbanas e rurais do município estão expostos a infecção natural por *E. canis*, agente causador da erliquiose monocítica canina;
- A frequência de cães sororreativos foi maior nos animais da zona rural do município estudado;
- O sequenciamento do fragmento da PCR amplificado, baseada no gene *dsb* confirmou pela primeira vez a detecção de *E. canis* em amostras de sangue e carrapatos obtidos de cães do município de Caxias-MA.
- Mediante a importância da EMC no Brasil, sugere-se a realização de outros estudos sorológicos e moleculares no Maranhão. As condições ambientais e os fatores climáticos apresentados pelo Estado são propícios para o desenvolvimento do vetor, o carrapato *R. sanguineus*. Por sua vez, a carência de cuidados quanto ao controle de ectoparasitos favorecem a disseminação do agente etiológico, *E. canis*, e o estabelecimento da enfermidade nos cães.
- A frequência de cães infectados do município evidencia que os proprietários estão expostos à carrapatos contaminados, representando risco de infecção. Diante dessas observações, sugere-se a implantação de programas específicos de controles de vetores artrópodes de riquetsioses no município de Caxias.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANZÉN, J. G.; CHAVES, A. V.; CASAS, E. A.; LI, O. E. Soroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina em tres distritos de Lima. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, n.14, p.43-48, 2003.

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. 2006. 95f. In.: Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses. Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. 2006.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007a.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 126-132, 2007b.

AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. *In vitro* isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489-493, 2008.

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

AKTAS, M.; ALTAY, K.; DUMANLI, N.; KALKAN, A. Molecular detection and identification of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in ixodid ticks. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1243-1248, 2009.

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

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4692– 4693, 1997.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. 2011. 88f. In.: Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses. Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. 2011.

ALMEIDA, A. B. P. F.; PAULA, D. A. J.; DAHROUG, M. A. A.; FREITAS, A. G.; SILVA, J. N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1123-1126, 2012.

ALMOSNY, N. R. P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935): **avaliação parasitológica, hematológica, bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 115f. In.: Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1998.

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

ALVES, R. N.; RIECK, S. E.; UEIRA-VIEIRA, C.; LABRUNA, M. B.; BELETTI, M. E. Isolation, *in vitro* propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an *Ehrlichia canis* strain from southeastern Brazil. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 241-248, 2014.

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

ANDRÉ, M. R.; DUMLER, J. S.; SCORPIO, D. G.; TEIXEIRA, R. H. F.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 247– 253, 2012.

ARAES-SANTOS, A. I.; MORAES-FILHO, J.; PEIXOTO, R. M.; SPOLIDORIO, M. G.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, M. M.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. Ectoparasite Infestations and Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v.15, n. 11, 2015.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 115-129, 1961.

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

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Research**, v. 38, p.257–259, 1996.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Butantan, 2006.

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

BRAGA, I. A.; SANTOS, L. G. F.; MELO, A. L. T.; JAUNE, F. W.; ZILIANI, T. F.; GIRARDI, A. F.; AGUIAR, D. M. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 470-474, 2013.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO, J. R. 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.

CANATTO, B.D.; SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; MENDES, M. C. N. C.; PARANHOS, N.T.; DIAS, R. A. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 64, n. 6, p.1515-1523, 2012

CARDÉNAS, A. M.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTVET, R. E.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 123–128, 2007.

CARLOS, R. S.; MUNIZ NETA, E. S.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L.; DE BRITO, R. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus- Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 117-120, 2007.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 657-662, 2008.

CARVALHO, I.T.S.; MELO, A. L.T.; FREITAS, L. C.; VERÇOZA, R.V.; ALVES, A. S.; COSTA, J. S.; CHITARRA, C. S.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; PACHECO, R. C.; AGUIAR, D. M. Minimum infection rate of *Ehrlichia minasensis* in *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma sculptum* ticks in Brazil. **Ticks Tick-borne Diseases**, (Article in press), 2016.

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

CHIARI, M. F. **Nova metodologia de diagnóstico para *Ehrlichia canis*: PCR X LAMP**. 2010. 72f. In.: Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2010.

CICUTTIN, G. L.; DE SALVO, M. N.; GURY DOHMEN, F. E. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016. No prelo.

CICUTTIN, G. L.; TARRAGONA, E. L.; SALVO M. N.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks Tick-borne Diseases**, (Article in press), 2015.

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

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

COSTA, A. P. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Ehrlichia*, *Babesia* e *Rickettsia* em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do Leste Maranhense, microrregião de Chapadinha, estado do Maranhão**. 2011. 101f. In.: Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, São Luís. 2011.

COSTA, A. P.; SILVA, A. B.; COSTA, F. B.; XAVIER, G. S.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; GUERRA, R. M. S. N. C. A Survey of Ectoparasites Infesting Urban and Rural Dogs of Maranhão State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, p. 674-678, 2013.

COSTA, A. P.; COSTA, F. B.; LABRUNA, M. B.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; SOARES, J. F.; SPOLIDORIO, M. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 28-35, 2015.

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

D'AGNONE, A. S. **Soroepidemiologia e avaliação citológica e molecular da infecção por *Ehrlichia* sp. em cães de uma população hospitalar**. Londrina. 2002. 131f. Dissertação apresentada no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Estadual de Londrina. 2002.

D'AGNONE, A. S.; MORAIS, H. S.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 285-290, 2003.

D'AGNONE, A.S. **Caracterização molecular de espécies da Família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande - MS**. 2006. 118f. Tese

apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista São Paulo. 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 151–154, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173-185, 2008a.

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

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 26, 2010.

DAVOUST, B. L. Ehrlichiose canine. **Le point Veterinaire**, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DOYLE, C. K.; 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 Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, 7, p. 504-510, 2005.

DOYLE, C. K.; NETHERY, K. A.; POPOV, V. L.; MCBRIDE, J. W. Differentially Expressed and Secreted Major Immunoreactive Protein Orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* Elicit Early Antibody Responses to Epitopes on Glycosylated Tandem Repeats. **Infection and Immunity**, v.74, p. 711-720, 2006.

DUMLER, J. S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C. P. J.; DASH, 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*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J. S. Ehrlichiosis in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment, **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, supplement 1, p.45–51, 2007.

FAIERSTEIN, C. C.; SILVA, E. P.; FEBRÔNIO, A. M. B. Notas sobre a Erliquiose canina no município de Aracajú, SE (2006-2007). **Biologia Geral Experimental**, v. 2, n. 8, p. 5-7, 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p. 783-791, 1985.

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

GEPLAN. Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico (**Atlas do Maranhão**). Segunda edição. São Luís: GEPLAN. Governo do Estado do Maranhão. 2002.

GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M. R.; SOARES J. F.; GONÇALVES, L. R.; OLIVEIRA, M. T.; COSTA, M. M.; LABRUNA, M. B.; BORTOLINI, C. E.; MACHADO, R. Z.; VIEIRA, M. I. B. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 172-178, 2016.

GREENE, C. E. Ehrlichia and Anaplasma Infections. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Fourth Edition. Ed. Saunders Elsevier. Cap. 26, p. 227 – 260, 2012.

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. Clinical, microbiology and infectious diseases of the dog and cat. **Saunders**, p. 545-557, 1984.

GROVES, M. G.; DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by Thicks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GUERRA, R. M. S. N.; BRITO, D. R. B. Ixodofauna de mamíferos domésticos da Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Entomology y Vectores**, v. 11, p. 435-444, 2004.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Research**, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; WARNER, T.; BARK, H.; JONGEJAN F.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; WARNER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal**, (article in press), 2010.

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

HEGARTY, B. C.; LEVY, M. G.; GAGER, R. F.; BREITSCHWERDT, E. B. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 32–38, 1997.

HIBBLER, S. C.; HOSKINS, J. D.; GREENE, C. E. Rickettsial Infections in Dogs. Part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thombocytopenia. **Compendium on Continuing Education for The Practising Veterinarian**, v. 8, n. 2, p.106-114, 1986.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Ehrlichiae: Ehrlichia, Cowdria e eorickettsia. **Microbiologia Veterinária**. Editora Guanabara Koogan S.A. Cap. 54, p. 276 –280, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Populacional. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=210300>>. Acesso em: 05 jan 2016. 2013.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1658-1662, 1994.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P. Erliquiose Canina – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano IX, n. 18, 2012.

KAVINSKI, L. C. Ocorrência de um caso de erliquiose canina em Curitiba - PR. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1-2, p. 217-219, 1988.

KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F.; SOARES, J. F.; LOPES, S. T. A. Serological survey on *Ehrlichia* sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 415-417, 2012.

KRAWCZAK, F. S.; REIS, I. A.; SILVEIRA, J. A.; AVELAR, D. M.; MARCELINO, A. P.; WERNECK, G. L.; LABRUNA, M. B.; PAZ, G. F. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n. 1, p.64-68, 2015.

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

LABRUNA, M. B.; HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, Eastern Amazon-Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.37, p.774-776, 2000.

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

LABRUNA, M. B. Biologia –ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JACOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S. Ticks

(Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 149-163, 2005.

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

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

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N. R. Prevalence of *Ehrlichia canis* Infection in Thrombocytopenic Dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology** v.34, p. 44-48, 2005.

MAFRA, C.; BARCELOS, R. M.; MANTOVANI, C.; CARRIZO, J.; SOARES, A. C.; MOREIRA, H. N. S.; MAIA, N. L.; SILVA, F. F. R.; SILVA, V. H. D.; BOERE, V.; SILVA, I. O. Occurrence of *Ehrlichia canis* in free-living primates of the genus *Callithrix*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 78-81, 2015.

MAKINO, H.; SOUSA, V. R. F.; FUJIMORI, M.; RODRIGUES, J. Y.; DIAS, A. F. L.R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; ALMEIDA, A. B. P. F. *Ehrlichia canis* detection in dogs from Várzea Grande: a comparative analysis of blood and bone marrow samples. **Ciência Rural**, v.46, n.2, p.310-314, 2016.

MARTINS, T. F.; SPOLIDORIO, M. G.; BATISTA, T. C. A.; OLIVEIRA, I. A. S.; YOSHINARI, N. H.; LABRUNA, M. B. Ocorrência de carrapatos (Acari: Ixodidae) no município de Goiatins, Tocantins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 50-52, 2009.

MAVROMATIS, K. K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M. P.; CHAIN, P.; SHIN, M.; MALFATTI, S.; LARIMER, F.; COPELAND, A.; DETTER, J. C.; LAND, M.; RICHARDSON, P. M.; YU, X. J.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; KYRPIDES, N. C. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals

themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4015-4023, 2006.

MELO, A.L.T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, p. 112–116, 2016.

MENDONÇA CS, MUNDIM AV, COSTA AS, MORO TV. 2005. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, v.21, n.1, p. 167-174.

MESSICK, J. B.; RIKIHISA, Y. Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization and proliferation in host cells by flow cytometry. **Infection Immunology**, v. 61, p. 3803-3810, 1993.

MINERVINO, A. H. H.; LIMA, J. T. R.; SOARES, H. S.; MALHEIROS, A. F.; MARCILI, A.; KRAWCZAK, F. S.; LOPES, M. G.; MARTINS, T. F.; MOREIRA, T. R.; RIBEIRO, M. F. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of Tick-Borne Pathogens and Tick Infestation in Dogs from Tapirapé and Karajá Indigenous Communities, Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 7, p. 412-418, 2015.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLoS ONE**, v. 10, n.9, p. 1-16, 2015.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, supl. 2, p. 141-147, 2003.

NICHOLSON, W. L.; ALLEN, K. E.; MCQUISTON, J. H.; BREITSCHWERDT, E. B.; LITTLE, S. E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 205–212, 2010.

NYINDO, M. B. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. **American journal of Veterinary Research**, v.32, n.11, p.1651-1658, 1971.

OLIVEIRA, D.; TIE, N. C.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot- ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 9, n.1, p.1-5, 2000.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURA, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, Supplement. 2, p. 55-56, 2009.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Characterization of ticks infecting dogs in a hospital population in North Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

OTTO, T. D.; VASCONCELLOS, E. A.; GOMES, L. H. F.; MOREIRA, A. S.; DEGRAVE, W. M.; MENDONÇA-LIMA, L.; ALVES-FERREIRA, M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 861-871, 2008.

PAZ, G. F.; LABRUNA, M. B.; FUGISAKI, E. Y. M.; PINTER, A. S.; FREITAS, C. M. V.; LEITE, R. C. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) de cães. **Revista Brasileira de Patologia**. v. 37, p. 234, 2001.

PERILLE, A. L.; MATUS, R. E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, p.195-198, 1991.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (northeastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, 1115-1120, 2010.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, p. 285-289, 1997.

RIKIHISA, Y. The Ehrlichiae and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 286-308, 1991

RISTIC, M. Protozoal diseases: babesiosis. In: BONE, J.F. et al. **Equine medicine and surgery**. Illinois: **American Veterinary Publications**, p.137-144, 1972.

RISTOW, L. E.; PEREZ JUNIOR, A. A.; TAVARES, C. A. P. Prevalency study of seropositive dogs for *Ehrlichia sp* in serological tests made in TECSA laboratórios. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, 2009.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 10, p. 13-19, 2001.

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

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 75-79, 2005.

ROTONDANO, T. E. F.; ALMEIDA, H. K. A.; KRAWCZAK, F. S.; SANTANA, V. L.; VIDAL, I. F.; LABRUNA, M. B.; AZEVEDO, S. S.; ALMEIDA, A. M. P.; MELO, M. A. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 52-58, 2015.

SANTOS, F.; COPPEE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The veterinary Journal**, (article in press), 2007.

SANTOS, L. G. F.; MELO, A. L. T.; MORAES-FILHO, J.; WITTER, R.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 114-118, 2013.

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. 74-78, 2001.

SHIBATA SI, 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.

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

SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 13-16, 2006.

SOUSA, V. R. F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por Ehrlichia canis e Anaplasma platys**. 2006. 46 f. In.: Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. do B. P. F. de; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. da S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. do; Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. Clinical and molecular evaluation of dogs with ehrlichiosis. **Ciência Rural**, v.40, n.6, 2010.

SOUSA, K. C. M. **Co-infecção por Ehrlichia canis, Leishmania chagasi e Babesia canis em cães naturalmente infectados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2012. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP). Jaboticabal. 2012.

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

STATPOINT TECHNOLOGIES, I. Statgraphis® Centurion XVI (software). 2006. (Cited 2016 jul 16). Available from: <http://www.statgraphics.com>.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v. 25, p. 909-916, 2001.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v.130, p. 131–140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M.; FERREIRA, F. A.; PAJUABA NETO, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 72–74, 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729. 2013.

TANIKAWA, A.; LABRUNA, M. B.; COSTA, A.; AGUIAR, D. M.; JUSTINIANO, S.V.; MENDES, R. S.; MELO, A.L.T.; ALVES, C. J.; Azevedo, S. S. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 474–477, 2013.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, 2007.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p. 4673-4690, 1994.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v.140, p. 223-230, 2006.

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

VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; NASCIMENTO, D. A. G.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 104-109, 2013a.

VIEIRA, R. F. C.; VIEIRA, T. S. W. J.; NASCIMENTO, D. A. G.; MARTINS, T. F.; KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W., VIDOTTO, O. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 335-340, 2013b.

WANER, T.; HARRUS, S.; 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.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmosse trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, supl. 2, p. 3811-3822, 2013.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 75-99, 1991.

ANEXOS

Anexo 1-Ficha clínica

Data de coleta: ____/____/____ Animal _____

Idade: _____ Castração: ()sim ()não Raça: _____

Porte: () pequeno () médio () curto pelagem/cor: _____ () curto () longo

Histórico

Local de nascimento: ()Caxias-MA Outro: _____

Permanece no local onde mora: ()sim ()não Quais outros lugares? _____

Hábitos do animal

()vive no quintal/campo ()passeios à rua ()vive dentro de casa () canil

Suspeitas

Antecedentes clínicos: Já teve hemoparasitose? ()sim ()não

Alterações clínicas gerais: ()febre ()apatia ()perda de peso

- Erliquiose: ()secreção ocular/nasal ()sangramento nasal ()diarreia sanguinolenta ()incoordenação

- Ectoparasitos: Possui ectoparasitos? ()sim ()não Quais? ()carrapatos ()pulgas

- Infestação: ()leve ()moderada ()intensa

- Faz controle de ectoparasitos? ()sim ()não Frequência ()1x/15dias ()1x/mês ()maior

- Utiliza produtos ectoparasiticidas no ambiente: ()sim ()não

Frequência: ()1x/semana ()2x/semana ()1x/15dias ()1x/mês

()maior

Observações: _____

Anexo 2-Termo de Autorização

Eu, _____ autorizo por meio deste documento, a coleta de sangue e carrapatos do(s) animal(ais) _____ de minha propriedade, para fins de pesquisa na Universidade Estadual do Maranhão, bem como informo estar ciente das informações referentes a minha identidade na divulgação dos resultados do presente estudo.

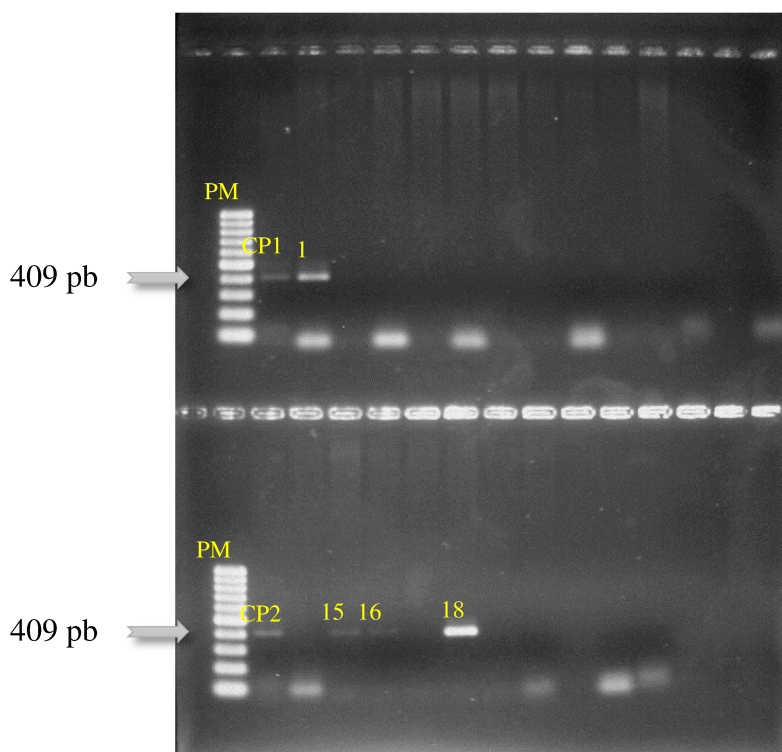
Assinatura do(a) proprietário(a) do(s) animal(ais)

Anexo 3-Protocolo de extração de DNA com Nacl

(ALJANABI; MARTINEZ, 1997)

1. Triturar o material (carrapato ou pulga) em N₂ líquido ou vidro em pó;
2. Adicionar 400µl de buffer A;
3. Adicionar 40µl de SDS 20% e 8µl de proteinase K (20mg/ml);
4. Misturar no vórtex;
5. Incubar 55-56°C por 1 hora;
6. Adicionar 300µl de Nacl 6M (ou 360µl de Nacl 5M);
7. Vórtex por 30s;
8. Centrifugar a 10 000 rpm/30minutos à 4°C;
9. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e precipitar com igual volume de isopropanol por 1 hora à -20°C (600µl);
10. Centrifugar a 10.000 rpm/10minutos à 4°C;
11. Desprezar o sobrenadante;
12. Colocar o mesmo volume (aproximadamente 600µl) de etanol 70°GL (Lavar o pellet);
13. Centrifugar a 10.000 rpm/10minutos (colocar papel toalha na UV);
14. Descartar o sobrenadante;
15. Inverter o tubo sobre o papel toalha para secar por aproximadamente 30 minutos;
16. Resuspender o pellet em 25µl de H₂O milliQ;
17. Encaminhar o material à PCR ou estocá-lo à -20°C.

Anexo 4-PCR de amostras sanguíneas, usando iniciadores genéricos Dsb-330/Dsb-728 para *E. canis*. Poços 1,15,16 e 18 – Amostras positivas. PM=Peso molecular; CP1=Controle positivo1; CP2=Controle positivo2.



Anexo 5- PCR de carrapatos, usando iniciadores genéricos Dsb-330/Dsb-728 para *E. canis*. Poços 2,4,6,8,10,14,22,23 – Amostras positivas. PM=Peso molecular; CP1=Controle positivo1.

