

LUCIANA SOUZA DE OLIVEIRA

**Investigação molecular de *Ehrlichia* em uma população de
cães e gatos em Viçosa/MG**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para a obtenção do Título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

LUCIANA SOUZA DE OLIVEIRA

**Investigação molecular de *Ehrlichia* em uma população de
cães e gatos em Viçosa/MG**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para a obtenção do Título de *Magister
Scientiae*.

Aprovada: 14 de Fevereiro de 2008.

Prof^a. Márcia Rogéria de
Almeida Lamêgo
(Co-Orientadora)

Prof^o. Márcio Antônio Moreira
Galvão
(Co-Orientador)

Prof^o. José Antônio Viana

Prof^a Simone Eliza Facioni
Guimarães

Prof^o. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

Aos meus pais, Mário e Maria, pela renúncia, amor incondicional e pelos exemplos de vida. Aos meus irmãos Fernanda e Paulo César e ao Kaabah pelo amor e apoio.

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também
sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."
(Anatole France)*

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof^o Cláudio Mafra, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho e pela amizade.

À Prof^a Márcia Rogéria, pela co-orientação, pela amizade e por sempre disponibilizar o Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) para a realização de qualquer experimento.

Aos Prof^o. Márcio Antônio Moreira Galvão e Prof^o. Lissandro Gonçalves Conceição pela co-orientação.

Ao Prof^o. José Dantas Ribeiro Filho, por autorizar que o Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Veterinária fornecesse as amostras analisadas e pela disponibilidade em me ajudar.

A todos do professores e funcionários Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo apoio de forma especial aos funcionários Eduardo, Reginaldo, Adenílson e Serafim por toda a ajuda.

À Maria Lucinda Fonseca, ao Luis Márcio Cardoso e ao Aécio Carlos de Oliveira do Laboratório de Análises Clínica/DVT, que com muita disponibilidade forneceram as amostras e os resultados do hemograma.

Ao Prof^o. Fabyano Fonseca pela colaboração nas Análises Estatísticas.

Ao Vinicius do Laboratório de Biologia e Estrutural e ao Anderson do Laboratório de Bioquímica Animal pela ajuda na microscopia e fotografia do esfregaço sanguíneo.

Ao Prof^o Marcelo Bahia Labruna, da Universidade de São Paulo, por fornecer o controle positivo para *Ehrlichia canis*.

Ao Dr. David H. Walker do *Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, EUA* por fornecer

controle positivo para *Ehrlichia* sp. e também pelo apoio financeiro e científico.

Aos amigos, Edvaldo, Karla, Luíza, Marlos, Thiago e Wiliane, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários pela excelente convivência, pela força e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal pelo apoio e colaboração.

Às grandes amigas “da Bioquímica” Camilla, Hebréia, Juliana e Thaís pela força nos momentos difíceis e por me proporcionarem inúmeros momentos de alegria.

Às amigas da república, da “antiga” e da “nova” geração, por terem sido minha família em Viçosa.

Aos meus pais, Mário e Maria, por todo amor a mim oferecido, pela força nos momentos difíceis, por aceitarem a minha ausência. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

À minha irmã-amiga, Fernanda, por sempre abrir as portas para mim, pelo zelo, amor e presença em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Paulo, pelo exemplo de vida e por me contagiar com a sua alegria de viver.

Ao Kaabah pelo amor, paciência, amizade, dedicação e por fazer os meus dias mais felizes.

E a todos os meus familiares e amigos, que mesmo distantes, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Por ser a minha força nos momentos de desânimo. Por sempre olhar por mim e permitir que tudo na minha vida acontecesse na hora certa e da melhor forma possível.

Obrigada, Senhor!

BIOGRAFIA

LUCIANA SOUZA DE OLIVEIRA, filha de Mário José Câmara de Oliveira e Maria das Dôres Souza Oliveira, nasceu em 06 de julho de 1983, em Janaúba – Minas Gerais. Em 05 de maio de 2006 graduou-se em Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais – Brasil.

Em 11 de maio do mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O gênero <i>Ehrlichia</i>	3
2.2. A erliquiose	6
2.2.1. Erliquiose canina	7
2.2.2. Erliquiose em felinos	8
2.2.3. Outras erliquioses	9
2.3. Espécies de <i>Ehrlichia</i>	11
2.3.1. <i>Ehrlichia canis</i>	11
2.3.2. <i>Ehrlichia ewingii</i>	14
2.3.3. Outras espécies de <i>Ehrlichia</i>	15
2.4. Imunidade	17
2.5. Carrapatos vetores	19
2.6. Diagnóstico	21
2.7. Tratamento	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Material a ser analisado	25
4.2. Extração de DNA	27
4.3. Reação em Cadeia pela Polimerase	28
4.4. Purificação dos produtos de PCR	30
4.5. Clonagem dos produtos de PCR purificados	30
4.6. Purificação dos Plasmídeos Recombinantes	31
4.7. Ensaio de Restrição	32
4.8. Sequenciamento e Análise das Sequências	32
4.9. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Detecção molecular de <i>Ehrlichia</i> em cães	34
5.2. Detecção molecular de <i>Ehrlichia</i> em gatos	43
5.3. Análise das Sequências	45
6. CONCLUSÃO	46
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	47
8. REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Características das espécies causadoras de erliquiose	6
Tabela 1. Diferenças na taxa de infecção por <i>E. canis</i> de acordo com raça, sexo e idade.	36
Tabela 2. Médias e desvios padrão para os parâmetros analisados dos animais infectados e não infectados por <i>E. canis</i> .	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Eletromicrografia de um leucócito com mórulas.	3
Figura 2A. Motivos para a realização dos exames no Laboratório de Análises Clínicas/DVT.	26
Figura 2B. Raça dos Animais.	26
Figura 3. Microscopia óptica de um esfregaço sanguíneo mostrando mórulas em monócitos.	34
Figura 4. Gel de agarose 1,2%. Resultado da <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> ECAN5-HE3	34
Figura 5. Número de cães com erliquiose dentro de cada suspeita clínica.	36
Figura 6. Gel de agarose 1,2%. Resultado da <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> EE5/HE3 e Dsb-321/Dsb-671-ew.	41

ABREVIATURAS

µL: Microlitro	mg: Miligrama
µm: Micrômetro	MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária	mL: Mililitro
C: Base nucleotídica citocina	mM: Milimolar
CDC: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	N: Normal
CGE: Erliquiose granulocítica canina	NK: Células Natural Killer
CHGM: Concentração de hemoglobina globular média	nm: Nanometro
CME: Erliquiose monocítica canina	°C: Grau Celsius
DBB: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular	OD: Densidade óptica
DC: Células dense-cored	OMP: Proteína da Membrana Externa
DNA: Ácido desoxiribonucléico	pb: Pares de bases
dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato	PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase
DVT: Departamento de Veterinária	PLT: Plaqueta
EDTA: Ácido etileno diamino tetracético	RBC: Células vermelhas sanguíneas
G: Base nucleotídica guanina	RC: Células reticulares
groESL: Operon dos genes das proteínas do choque térmico	RNA: Ácido ribonucléico
h: Hora	rpm: Rotação por minuto
HCT: Hematócrito	rRNA: RNA ribossômico
HGB: Hemoglobina	S: Coeficiente de sedimentação (unidade: Svedberg)
HGE: Erliquiose granulocítica humana	SD: Desvio padrão
HGM: Hemoglobina globular média	SDS: Dodecil sulfato de sódio
HME: Erliquiose monocítica humana	STAT: Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
IFN: Interferon	TE: Tris-EDTA
IL: Interleucina	TNF: Fator de Necrose Tumoral
IOE: <i>Ehrlichia Ixodes ovatus</i>	U: Unidade
JAK: Janus quinases	UFV: Universidade Federal de Viçosa
LB: Luria-Bertani	USP: Universidade de São Paulo
m: Média	UTMB: <i>University of Texas Medical Branch</i>
M: Molar	VGM: Volume globular médio
Mb: megabases	VHE: <i>Ehrlichia Humana Venezuelana</i>
	WBC: Células brancas sanguíneas

RESUMO

OLIVEIRA, Luciana Souza de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Investigação Molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos em Viçosa/MG.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Orientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Márcio Antônio Moreira Galvão e Lissandro Gonçalves Conceição.

O gênero *Ehrlichia* compreende bactérias pequenas, gram-negativas, pleomórficas, de vida intracelular obrigatória que infectam diferentes células sanguíneas e que são transmitidas por carrapatos a cães, equinos, ruminantes, felinos e ao homem. Estes organismos encontram-se mundialmente distribuídos, com hospedeiros vertebrados apresentando manifestações clínicas que podem variar geograficamente. O diagnóstico clínico da erliquiose é difícil, pois suas manifestações são facilmente confundíveis com outras doenças infecciosas. Este trabalho teve como objetivo verificar a incidência de *Ehrlichia* em populações de cães e gatos em Viçosa/MG. Para isso, 100 amostras de sangue de cães e 15 amostras de sangue de gatos que chegaram ao Laboratório de Análise Clínicas/Hospital Veterinário/DVT/UFV para a realização de exames foram testadas por *nested*-PCR, quanto à presença de *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii* com *primers* espécie-específicos. Foram encontrados 32 cães infectados com *E. canis*, 5 cães infectados com *E. ewingii* e 3 gatos infectados por *E. canis*. Coinfecção por *E. canis* e *E. ewingii* ocorreu em 4 cães. Os principais achados hematológicos em cães infectados com *E. canis* foram anemia normocítica normocrômica (56,25%), trombocitopenia (43,7%), eosinopenia (34,4%) e neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo (34,4%). Verificou-se que *E. canis* é um patógeno comum em cães de Viçosa/MG. Estes são os primeiros relatos de *E. ewingii* em cães e de *E. canis* em gatos da América do Sul. Isso reforça a necessidade de maior atenção dos profissionais da saúde à erliquiose no Brasil. Mais estudos são necessários para entender o papel dos gatos na epidemiologia da erliquiose e de carrapatos vetores e cães como reservatórios de *E. ewingii*, já que esta espécie tipicamente causa infecções em humanos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Luciana Souza de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. **Molecular Investigation of *Ehrlichia* in population of dogs and cats in Viçosa/MG**. Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Márcio Antônio Moreira Galvão and Lissandro Gonçalves Conceição.

The genus *Ehrlichia* encompass a group of small, gram-negative, pleomorphic, obligatory intracellular bacteria that infect different blood cells and are transmitted by ticks to dogs, equines, ruminants, felines and humans. These organisms are distributed worldwide, with vertebrate hosts presenting clinical manifestations that may vary geographically. The clinical diagnosis of ehrlichiose is difficult, because its manifestations are similar to other infectious diseases. The aim of study was to evaluate the incidence of *Ehrlichia* in populations of dogs and cats of Viçosa, Minas Gerais State. For this, 100 blood samples from dogs and 15 blood samples from cats examined at the Laboratory of Clinical Analysis/Veterinary Hospital/DVT/UFV were tested by nested-PCR with species-specific primers for the presence of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Ehrlichia canis* was detected in 32 dogs, *E. ewingii* in five dogs and *E. canis* in three cats. Coinfection by *E. canis* and *E. ewingii* occurred in four dogs. The most common hematological abnormalities in dogs infected with *E. canis* were normocytic normochromic anemia (56.25%), thrombocytopenia (43.7%), eosinopenia (34.4%) and neutrophilia with regenerative left shift (34.4%). *Ehrlichia canis* is a common pathogen in dogs of Viçosa/MG. These are the first reports of *E. ewingii* in dogs and *E. canis* in cats of South America. This shows the need for greater attention from health professionals to ehrlichiosis in Brazil. More researchs are needed to understand the role of cats in the epidemiology of ehrlichiose and ticks vectors and dogs as reservoirs of *E. ewingii*, since this species typically cause infections in humans.

1. INTRODUÇÃO

A emergência de novas, e a reemergência de doenças transmitidas por artrópodes são desafios para a medicina veterinária e humana. Ambos, os artrópodes e as infecções transmitidas por eles, estão expandindo seus limites zoogeográficos devido à mudança climática e à maior acessibilidade a certos nichos ambientais (SHAW *et al.*, 2001).

O Brasil ocupa o segundo lugar em população de pequenos animais, perdendo somente para os Estados Unidos. Estima-se que no Brasil existam 27,9 milhões de cães e 12 milhões de gatos (IBGE). A erliquiose, doença transmitida por carrapatos, é considerada a principal doença infecciosa dos cães. A erliquiose canina clássica é causada por *Ehrlichia canis*, entretanto o cão também pode ser infectado por outras espécies de *Ehrlichia*, tais como *E. ewingii* e *E. chaffeensis*.

Ehrlichia é mantida na natureza por infecção persistente em hospedeiros vertebrados. Os humanos são hospedeiros acidentais destes patógenos e os casos recentes de erliquiose em humanos têm sido associados com mudanças ecológicas, demográficas e na susceptibilidade dos hospedeiros (PADDOCK & CHILDS, 2003).

Ehrlichia canis é a principal espécie de *Ehrlichia* reconhecida no Brasil e já foi relatada em quase todas as regiões brasileiras (DAGNONE *et al.*, 2003, LABRUNA *et al.*, 2007). Embora seja raro, infecções humanas por *E. canis* foram relatadas na Venezuela em pacientes assintomáticos e sintomáticos (PEREZ *et al.*, 1996; 2006).

Ehrlichia ewingii foi inicialmente reconhecida como agente da erliquiose granulocítica canina sendo posteriormente reconhecida como agente da erliquiose granulocítica em humanos (BULLER *et al.*, 1999).

No Brasil, pouco se conhece sobre erliquiose humana, seus agentes etiológicos, prevalência ou ecologia. Porém, sabe-se da presença de espécies de *Ehrlichia* circulando entre cães e seus ectoparasitos (GALVÃO *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2007; DAGNONE *et al.*, 2003), denotando a possibilidade de acometimento humano dessa enfermidade. Associando-se a isto, o relato da ocorrência dos primeiros casos de erliquiose humana no

Brasil (CALIC *et al.*, 2004; da COSTA *et al.*, 2006), ressalta a necessidade de estudos para o melhor conhecimento da história natural da doença.

A utilização de técnicas que permitem distinção entre as diferentes erliquioses é essencial para o desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica e, conseqüentemente, a prevenção de novos casos. Destaca-se, aqui, a aplicação de diagnóstico molecular, que tem possibilitado a caracterização de novas espécies de *Ehrlichia* bem como esclarecimentos importantes com relação a outras já descritas.

Sendo assim, o presente trabalho visa obter mais informações a respeito da presença de organismos do gênero *Ehrlichia*, especialmente *E. canis* e *E. ewingii*, circulantes em populações de cães e gatos em Viçosa, estado de Minas Gerais, por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Ehrlichia*

O gênero *Ehrlichia* pertence à família *Anaplasmataceae* e Ordem *Rickettsiales*. A ordem *Rickettsiales* e outras α -proteobactérias possuem uma relação evolucionária com os progenitores das mitocôndrias (ANDERSSON *et al.*, 1998). Esta ordem é formada pelas famílias *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae* e seus representantes são parasitas intracelulares obrigatórios com ciclo de vida envolvendo hospedeiros invertebrados e vertebrados.

Os *Rickettsiaceae* replicam diretamente no citosol de células endoteliais, ao passo que os *Anaplasmataceae* replicam em células sanguíneas dentro de um vacúolo derivado de membrana conhecido como mórula (Figura 1) (DUMLER *et al.*, 2001). A única exceção dentro da família *Anaplasmataceae* é o gênero *Wolbachia* que infecta artrópodes e nematodos, mas não infecta vertebrados diretamente.



FIGURA 1. Eletromicrografia mostrando mórulas em um leucócito de um paciente com erliquiose. As setas mostram uma *Ehrlichia* individual. Fonte: www.cdc.gov. Acessado em 15/01/2008.

As bactérias do gênero *Ehrlichia* são responsáveis por duas zoonoses emergentes (erliquiose monocítica humana e erliquiose granulocítica

humana) e causam graves doenças de importância médico veterinária como a erliquiose monocítica canina.

Como todos os membros da família *Anaplasmataceae* são bactérias intracelulares obrigatórias, estes organismos são menos caracterizados quando comparados a outras bactérias facultativas ou extracelulares, devido à dificuldade ou até mesmo à impossibilidade de cultivá-los e manipulá-los geneticamente.

Inicialmente, os organismos erliquiais eram classificados de acordo com a célula sanguínea comumente infectada (granulócito, linfócito, monócito ou plaquetas). Entretanto, este tipo de classificação foi considerado imprópria porque a mesma espécie de *Ehrlichia* pode ser encontrada em outras células que não a sua principal célula alvo (CDC, 2000).

Baseados nas seqüências do gene rRNA 16S, do operon groESL e de análises antigênicas, Dumler *et al.* (2001) reorganizaram a ordem *Rickettsiales* de forma que o gênero *Ehrlichia* passou a ser composto pelas espécies: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia (Cowdria) ruminantium*. Uma nova espécie de *Ehrlichia*, proximamente relacionada à *E. chaffeensis*, foi isolada a partir de carrapatos *Ixodes ovatus* no Japão (SHIBATA *et al.*, 2000). Esta espécie, ainda não reconhecida, é frequentemente referida como *Ehrlichia Ixodes ovatus* (IOE).

Os genomas das espécies *E. chaffeensis*, *E. canis* e *E. ruminantium* foram completamente seqüenciados e revelaram um alto grau de sintonia genômica (COLLINS *et al.*, 2005; HOTOPP *et al.*, 2006; MAVROMATIS *et al.*, 2006). Um exemplo desta sintonia genômica é a presença do sistema de secreção do tipo IVa que usa um complexo de proteínas transmembrânicas e um *pilus* para entregar macromoléculas efetoras de células procarióticas a células eucarióticas. O sistema de secreção tipo IV é um dos poucos conjuntos de genes sintênicos entre todos os *Rickettsiales* seqüenciados, sugerindo que uma coordenação fina da expressão desses genes é crítica (HOTTOP *et al.*, 2006).

Uma característica dos genomas erliquiais, bem como de outros organismos da ordem *Rickettsiales*, é o pequeno número de reguladores

transcricionais. Isso parece ser resultado de redução evolutiva acoplada à diminuição da demanda para regulação devido ao pequeno tamanho do genoma, bem como às condições relativamente estáticas fornecidas pelo ambiente intracelular da célula hospedeira (CASES *et al.*, 2003). Outra característica comum nestes genomas é a presença de uma única cópia dos genes rRNA com os genes rRNA 5S e 23S formando um *operon* separado do gene rRNA 16S (ANDERSON *et al.*, 1998; MAVROMATIS *et al.*, 2006). Isto difere de outros genomas bacterianos que, geralmente, contêm de uma a várias cópias de rRNAs em um *operon* 16S-23S-5S.

As Principais Proteínas da Membrana Externa (OMPs) são importantes na diversidade antigênica entre cepas da mesma espécie. Membros da família *Anaplasmataceae* possuem níveis variados de expansão da família dessas proteínas. A maior expansão desta família ocorre nos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Estes organismos não são transmitidos transovariamente por seus hospedeiros artrópodes, de forma que carrapatos só adquirem estes organismos ao se alimentarem em um hospedeiro vertebrado infectado. A expansão da família desta proteína pode permitir a persistência em vertebrados reservatórios por fornecer variedade antigênica, o que permite uma transmissão efetiva das bactérias aos carrapatos (HOTTOP *et al.*, 2006).

Por meio de microscopia eletrônica de *E. chaffeensis* em linhagem celular de mamíferos, foi revelado que esta bactéria possui duas formas morfológicas distintas dentro do endossomo: células pequenas chamadas de “dense-cored” (DC) (0,4 - 0,6 μm), e células reticulares (RC) maiores (0,4 - 0,6 μm por 0,7-1,9 μm). DC possuem um nucleóide denso. Em contraste, RC têm filamentos nucleóides uniformemente dispersos e ribossomos, algumas vezes, formando longas projeções da parede celular ou protusões da membrana citoplasmática dentro do espaço periplasmático (POPOV *et al.*, 1995). O ciclo de desenvolvimento começa com DC que adsorve e entra na célula hospedeira. DC rapidamente transforma em RC, dentro do vacúolo na célula hospedeira, que multiplica por fissão binária por aproximadamente 48 h e então amadurece em DC após 72 h após infecção. As DC maduras são liberadas e iniciam um novo ciclo de infecção (ZHANG *et al.*, 2007). Portanto

DC é a forma infecciosa, enquanto RC é a forma replicativa de *E. chaffeensis*.

A mórula mede de 1,0 a 6,0 µm e contém de um a mais de 40 organismos de formas celulares uniformes ou diferentes. O espaço intramorular contém uma matriz fibrilar estriada e túbulos intramorulares de 25 nm de diâmetro e 1,5 µm de comprimento que são originados da membrana de células reticulares. Em cultivo celular de células humanas infectadas, as mitocôndrias das células do hospedeiro estão frequentemente localizadas às margens da mórula (POPOV *et al.*, 1995).

2.2. A erliquiose

Os organismos erliquiais encontram-se mundialmente distribuídos sendo que várias espécies de *Ehrlichia* estão relacionadas à erliquiose em diversos animais tais como cães, equinos, ruminantes, felinos e ao homem.

As bactérias que causam erliquiose agora pertencem a três gêneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia*, todos pertencentes à família *Anaplasmataceae*.

Erluquiose humana foi primeiramente reconhecida em 1953 com *Neorickettsia sennetsu*, em 1986 com espécies de *Ehrlichia* e em 1990 com espécies de *Anaplasma* (DUMLER *et al.*, 2007).

A Quadro 1 relaciona as espécies causadoras da erliquiose com seus principais vetores, hospedeiros secundários (geralmente vertebrados), a principal célula infectada e a sua distribuição geográfica.

Quadro 1. Características das espécies causadores da erliquiose (CDC, 2000; adaptada).

Espécie	Nome comum da doença	Principal vetor	Principal célula infectada	Principais hospedeiros secundários	Distribuição geográfica
<i>E. canis</i>	Erluquiose canina	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Células mononucleares	Cães, lobos, chacais	Mundial
<i>E. chaffeensis</i>	Erluquiose monocítica humana (HME)	<i>Amblyomma americanum</i>	Células mononucleares	Cães, cervídeos, cabra	EUA, Ásia, Europa, Brasil.
<i>E. ewingii</i>	Erluquiose granulocítica canina, erluquiose ewingii humana	<i>Amblyomma americanum</i>	Granulócitos	Cães	Eua, Camarões

<i>E. muris</i>	Infecção sistêmica em camundongos imunocomprometidos	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Células mononucleares	Roedores	Japão
<i>Anaplasma platys</i> (<i>E. platys</i>)	Trombocitopenia canina cíclica	Desconhecido	Plaquetas	Cães	EUA, Taiwan, Grécia e Israel
<i>Neorickettsia risticii</i> (<i>E. risticii</i>)	Febre equina Potomac (erliquiose monocítica eqüina)	Provavelmente helmintos em caramujos	Células mononucleares	Helmintos, provavelmente	EUA
<i>Neorickettsia sennetsu</i> (<i>E. sennetsu</i>)	Febre glandular e febre Sennetsu ou rickettsiose sennetsu humana	Provavelmente helmintos em peixes	Células mononucleares	Helmintos, provavelmente	Japão e Malásia
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (<i>Ehrlichia phagocytophila</i>)	Erliquiose granulocítica humana (HGE)	<i>I. scapularis</i> e <i>I. pacificus</i> (EUA); <i>I. ricinus</i> (Europa)	Granulócitos	Cervídeos, roedores selvagens, alces	EUA e Europa

2.2.1. Erliquiose canina

2.2.1.1. Erliquiose monocítica canina

Erliquiose monocítica canina (CME), causada por *E. canis*, é também referida como pancitopenia canina tropical. Esta bactéria causa uma doença febril sistêmica nos cães que geralmente é severa e pode ser fatal (SKOTARCZAK, 2003).

Clinicamente, esta doença evolui em três estágios: fase aguda, fase subclínica e fase crônica. A fase aguda começa após 8-20 dias seguintes à transmissão pelo carrapato infectado e dura de 2 a 4 semanas. A fase aguda é caracterizada por febre, depressão, anorexia, dispnéia e perda de peso. Achados laboratoriais incluem trombocitopenia, leucopenia, anemia moderada e hipergamaglobulinemia (SKOTARCZAK, 2003).

Com tratamento adequado, cães geralmente recuperam-se da infecção aguda, mas cães não tratados, ou tratados incorretamente podem desenvolver a infecção subclínica persistente e tornam-se portadores de *E. canis*. A fase subclínica pode durar de 40 a 120 dias, ou até mesmo por vários anos. Esta fase foi caracterizada experimentalmente por anormalidades hematológicas moderadas (trombocitopenia e diminuição significativa de leucócitos) (WANER *et al.*, 1997)

Cães que não eliminam a infecção desenvolvem a forma crônica severa, onde a falha da medula óssea e anemia levam a infecções oportunistas, baixa resposta ao tratamento e morte por hemorragia massiva (MAVROMATIS *et al.*, 2006).

2.2.1.2. Erliquiose granulocítica canina

Ehrlichia ewingii é o agente causador da erliquiose granulocítica canina (CGE). Esta bactéria, que infecta granulócitos caninos, é responsável por uma doença aguda moderada, que pode levar a poliartrite em cães cronicamente infectados (EWING *et al.*, 1971; ANDERSON *et al.*, 1992a).

Os sinais clínicos dessa doença não são específicos e incluem febre, letargia, anorexia, vômito e diarreia. Os achados laboratoriais mais freqüentes são: anemia normocítica, normocrômica e não regenerativa, trombocitopenia moderada com plaquetas maiores, linfopenia e eosinopenia (SKOTARCZAK, 2003).

2.2.2. Erliquiose em felinos

As espécies de *Ehrlichia* que naturalmente infectam felinos não foram ainda caracterizadas.

Inclusões como de erliquias foram detectadas em monócitos, linfócitos e granulócitos de gatos com doença febril e trombocitopenia (SHAW *et al.*, 2001). Evidências sorológicas de infecção por *E. canis* foram relatadas na Espanha (10,6%), França (8,3%) e Estados Unidos (13,2%) (BONI *et al.*, 1997 citados por ORTUÑO, *et al.*, 2005; AGUIRRE *et al.*, 2004).

Evidências moleculares confirmaram a presença de *E. canis* em gatos com sinais clínicos compatíveis com erliquiose monocítica na América do Norte (BREITSCHWERDT *et al.*, 2002).

No Brasil, Filoni *et al.* (2006) relataram a primeira evidência sorológica de *E. canis* em um puma da região do Pantanal.

Erliquiose granulocítica causada por *A. phagocytophilum* foi identificada e caracterizada em gatos da Suécia (BJOERSDORFF *et al.*, 1999). Evidências moleculares dessa espécie, em gatos, foram relatadas nos Estados Unidos, Dinamarca e no Reino Unido (SHAW *et al.*, 2001)

Sinais clínicos reportados em gatos com erliquiose são extremamente variados. Para a erliquiose monocítica, os sinais são: febre intermitente, anorexia, perda de peso, vômito e diarreia. Achados clinico-patológicos incluem anemia, trombocitopenia, leucopenia e hiperglobulinemia. Ainda é desconhecido se gatos tornam-se persistentemente infectados ou desenvolvem seqüelas imunes como resultados de infecção crônica, semelhante ao que ocorre em cães (SHAW *et al.*, 2001).

2.2.3. Outras erliquioses

2.2.3.1 Erliquiose humana

2.2.3.1.1 Erliquiose monocítica humana

A erliquiose monocítica humana (HME) causada por *E. chaffeensis* já foi descrita na América do Norte, Ásia e Europa, mas, somente recentemente, casos humanos com evidência sorológica compatível foram relatados no Brasil (CALIC *et al.*, 2004, COSTA *et al.*, 2005, COSTA *et al.*, 2006). Apesar dos primeiros casos de erliquiose humana terem sido confirmados somente recentemente no Brasil, Kelly *et al.*, em 1997, relataram os primeiros achados da presença de anticorpos para *E. chaffeensis* em pessoas saudáveis no sul da Amazônia.

O espectro clínico desta erliquiose vai de assintomático a severo ou infecção fatal. Sinais clínicos da HME são caracterizados por febre, dores de cabeça, mialgias, arrepios, “rash” em 20% dos pacientes, leucopenia, trombocitopenia, anemia e elevação dos níveis séricos das aminotransferases hepáticas (ANDERSON *et al.*, 1992b; BELONGIA *et al.*, 1999). Síndrome influenza-like é a forma clínica mais freqüente da HME (OLANO *et al.*, 2003).

Para alguns pacientes, a severidade das manifestações clínicas é diretamente relacionada com o nível de bacteremia, particularmente entre pacientes imunocomprometidos infectados com HIV (PADDOCK & CHILDS, 2003).

O diagnóstico de HME em pacientes infectados com HIV é geralmente confuso, pois, os sinais e sintomas da infecção erliquial mimetiza os achados

típicos comumente associados com infecção por HIV, suas complicações e reações aos medicamentos usados no tratamento destes pacientes (TALBOT *et al.*, 2003).

HME geralmente manifesta como doença moderada a severa e aproximadamente 60 a 70% dos pacientes com casos sérios têm sido hospitalizados. Em alguns pacientes, doença não tratada pode progredir rapidamente até a morte. Envolvimento multissistêmico frequentemente desenvolve em pacientes com doença severa e podem incluir insuficiência renal aguda, acidose metabólica, dispnéia, hipotensão severa, coagulopatia intravascular disseminada, insuficiência hepática, insuficiência adrenal e disfunção do miocárdio. Aproximadamente 20% das pessoas infectadas com *E. chaffeensis* desenvolvem sinais e sintomas de doença no sistema nervoso central, como encefalite, síndrome da meningite e síndrome encefalohepática (PADDOCK & CHILDS, 2003).

Pacientes com HME podem desenvolver uma síndrome tóxica fulminante ou choque séptico-*like*, particularmente em indivíduos com HIV, imunocomprometidos por transplante de órgãos, desordens imunes ou câncer (DUMLER *et al.*, 2007).

A taxa de letalidade estimada de HME é aproximadamente 3%. Metade dos casos de morte ocorre durante a segunda semana da doença e a morte é geralmente atribuída à falha multissistêmica, hemorragias ou infecções bacterianas ou fúngicas secundárias (PADDOCK & CHILDS, 2003).

2.2.3.1.2 Erliquiose granulocítica humana e Erliquiose ewingii humana

Anaplasma phagocytophilum, antigamente classificado como *Ehrlichia phagocytophila*, é o agente causador da erliquiose granulocítica humana (HGE). HGE é predominante nos Estados Unidos e a evidência de infecção também foi relatada na Europa e Ásia.

E. ewingii foi reconhecida como agente de infecção humana em 1999. Esta bactéria é similar, sorologicamente, à *E. chaffeensis*, mas semelhantemente à *A. phagocytophilum* se propaga dentro de neutrófilos (BULLER *et al.*, 1999).

Alguns pesquisadores também utilizam o termo erliquiose granulocítica humana para a infecção por *E. ewingii*, entretanto, para evitar confusão o termo erliquiose ewingii humana vem sendo mais utilizado.

Pessoas imunodeprimidas possuem maior risco para erliquiose ewingii humana. Entretanto poucas complicações e nenhuma fatalidade têm sido reportadas em comparação com HME e HGE (PADDOCK *et al.*, 2001).

O complexo de sintomas usuais de febre, dor de cabeça, mialgia, acoplados com trombocitopenia, leucopenia e níveis elevados de enzimas hepáticas são características mostradas por HME, HGE e erliquiose ewingii. Entretanto, existem algumas diferenças nas manifestações entre estas erliquioses. “Rash” e envolvimento do sistema nervoso central são mais freqüentes em pacientes com HME (PADDOCK & CHILDS, 2003; DUMLER *et al.*, 2007).

A taxa de fatalidade é 0,7% para HGE e está relacionada a complicações por infecções oportunistas (BAKKEN & DUMLER, 2000).

2.2.3.2. Heartwater

Heartwater é a doença causada por *E. ruminantium* que afeta todos os ruminantes domésticos. Esta doença fatal e importante economicamente, ocorre na África subsaariana, Madagascar e em várias ilhas Caribenhas (YU *et al.*, 2007).

Carrapatos *Amblyomma variegatum* são os principais vetores de *E. ruminantium* na África, exceto no sul, onde *Amblyomma hebraum* é provavelmente o vetor natural (YU *et al.*, 2007).

O controle dessa doença depende da disponibilidade de dados epidemiológicos acurados da infecção no vetor e hospedeiro (FABURAY *et al.*, 2007).

2.3. Espécies de Ehrlichia

2.3.1. Ehrlichia canis

Ehrlichia canis é o agente primário da erliquiose monocítica canina. A doença tem este nome devido ao tropismo de *E. canis* por monócitos e macrófagos. Esta bactéria é encontrada infectando principalmente canídeos

domésticos ou silvestres e foi primeiramente descrita em 1935 infectando cães na Algéria (DONATEIN & LESTOQUARD, 1935). Entretanto a espécie só foi reconhecida como de importância médico veterinária após 1963, devido a um surto em cães militares ingleses em Singapura e em cães militares americanos durante a Guerra do Vietnã (MAVROMATIS *et al.*, 2006).

O genoma de *E. canis* consiste de um cromossomo circular único de aproximadamente 1,3 Mb incluindo um total de 984 genes identificados e com 28,96% de conteúdo G+C (MAVROMATIS *et al.* 2006).

Não foram identificados genes que codificam proteínas do sistema de transporte e enzimas essenciais para a utilização de glicose e frutose no genoma de *E. canis*, sugerindo que esta bactéria seja aeróbica e incapaz de utilizar estes substratos como fonte de carbono e energia. Possivelmente, aminoácidos constituem a principal fonte de energia e de carbono para *E. canis* já que foram identificados enzimas e aminoácidos transportadores para a utilização de aspartato, glutamato, glutamina, prolina e arginina. Todas as enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico estão presentes, bem como as enzimas que permitem a transferência de aminoácidos para este ciclo. Esta bactéria ainda realiza a via gliconeogênica que termina em frutose-6-fostato, a via pentose-fostato não oxidativa completa, via biossintética para prolina, glutamato, glutamina, aspartato, lisina e arginina e a via parcial de biossintese de ubiquinona; além de possuir enzimas para a biossintese de purinas e pirimidinas, biossintese de lipídios e fosfolipídios, metabolismo de alguns cofatores e enzimas para a respiração aeróbica típica. O genoma contém ainda vários genes ortólogos envolvidos no sistema de transporte de membrana que podem fornecer os metabólitos necessários ausentes ou de vias metabólicas incompletas (MAVROMATIS *et al.*, 2006).

Enzimas de vias biossintéticas para nucleotídeos, cofatores e vitaminas, provavelmente desempenham um papel importante na interação da bactéria com seus hospedeiros e na sobrevivência intracelular, pois assim a bactéria não precisa competir por, e pode até fornecer, nutrientes para a célula hospedeira (HOTTOP *et al.*, 2006).

A prevalência de *E. canis* é dependente da distribuição do seu vetor, *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato marrom do cão, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Infecção experimental de *Dermacentor variabilis* por esta bactéria foi demonstrada por Johnson *et al.* (1998).

Em 1996, Perez *et al.* isolaram uma erliquia de um paciente humano aparentemente saudável na Venezuela denominando o isolado de VHE (*Ehrlichia Humana Venezuelana*). O isolado tinha morfologia ultraestrutural compatível com *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. muris*. Entretanto, a seqüência do gene rRNA 16S deste isolado foi altamente similar (99,9%) às seqüências de *E. canis* Florida (apenas uma base diferente em um total de 1434 pb) e *E. canis* Oklahoma (duas bases diferentes em um total de 1434 pb). Isto levou os pesquisadores a sugerirem que VHE é uma nova cepa ou subespécie de *E. canis* que causava uma infecção subclínica crônica em humanos.

Unver *et al.* (2001) compararam molecularmente e antigenicamente o isolado VHE com isolados de *E. canis* de cães e carrapatos da mesma região geográfica. Baseado na análise da seqüência do gene rRNA 16S e na análise de *Western immunoblot*, *E. canis* isolada de cães e carrapatos foram idênticas ao isolado VHE, sugerindo que a mesma cepa de *E. canis* é responsável por ambas erliquiose monocítica canina e humana na Venezuela.

Em 2006, Perez *et al.* relataram mais seis casos de pacientes humanos infectados com *E. canis* na Venezuela. Diferentemente do outro relato, os pacientes apresentavam sintomas compatíveis com a erliquiose monocítica humana (HME). As seqüências dos seis isolados possuíam a mesma mutação que a seqüência VHE.

Baseado nestes resultados foi possível sugerir que cães podem servir como reservatório de *E. canis* para infecções humanas e que carrapatos *R. sanguineus* podem servir como vetor.

A seqüência do gene rRNA 16S de um isolado de *Ehrlichia ovina*, uma espécie de *Ehrlichia* isolada a partir de ovelhas mas ainda não reconhecida, na Turquia apresentou apenas duas bases nucleotídicas diferentes de *E. canis* (BEKKER *et al.*, 2002). Em concordância a este fato, Unver *et al.* (2005) ao analisarem seqüências de rRNA 16S de *E. canis*

detectadas em cães da Turquia, observaram que uma das seqüências foi 100% idêntica à seqüência de *E. ovina* detectada em ovelhas neste mesmo país, sugerindo a possibilidade que *E. ovina* seja uma cepa de *E. canis*.

Os relatos de *E. canis* em humanos e a possibilidade de que *E. ovina* seja uma cepa de *E. canis*, demonstram que esta ehrlichia pode ter uma maior variedade de hospedeiros, não se restringindo a canídeos apenas.

Ehrlichia canis já foi relatada infectando cães em várias regiões do Brasil (GALVÃO *et al.*, 2002; DAGNONE *et al.*, 2003; LABRUNA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007). A maioria dos trabalhos de investigação de *E. canis* no Brasil, ocorre em populações de cães admitidas em hospitais veterinários, sendo que entre 20-30% dos animais investigados se mostram infectados com esta bactéria. A exposição dos cães ao carrapato *R. sanguineus* tem sido demonstrado ser um fator de risco para infecção por *E. canis* no Brasil (TRAPP *et al.*, 2002).

2.3.2. Ehrlichia ewingii

Ehrlichia ewingii foi descrita em 1971 por Ewing *et al.* como causador da erliquiose granulocítica canina. Em 1999, esta espécie foi descrita pela primeira vez em humanos causando a erliquiose granulocítica humana (HGE) ou erliquiose ewingii (BULLER *et al.*, 1999).

Pouco se conhece sobre esta espécie, pois ela ainda não foi propagada em cultivo celular. *Ehrlichia ewingii* é geralmente identificada por métodos moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) pela amplificação do gene do rRNA 16S. A seqüência deste gene em *E. ewingii* é 98% idêntica às seqüências de *E. canis* e *E. chaffensis*, sendo que as seqüências de *E. ewingii* obtidas a partir de cães ou de humanos são idênticas (YU *et al.*, 2007).

Até o momento, esta bactéria foi descrita infectando cães apenas nos Estados Unidos e Camarões (LIDDELL *et al.*, 2003, MURPHY *et al.*, 1998, NDIP *et al.*, 2005). Também nos Estados Unidos, *E. ewingii* foi detectada em veados (WOLF *et al.*, 2000).

O principal vetor de *E. ewingii* é o carrapato *Amblyomma americanum*, mas carrapatos *R. sanguineus* e *D. variabilis* já foram encontrados infectados com esta espécie (MURPHY *et al.*, 1998; NDIP *et al.*, 2007).

2.3.3. Outras espécies

2.3.3.1 *Ehrlichia chaffeensis*

Ehrlichia chaffeensis é o agente da erliquiose monocítica humana (HME). Seu principal hospedeiro vertebrado é o veado da cauda branca e o principal vetor é o carrapato *A. americanum*. Já foram encontrados cães, coiotes e cabras naturalmente infectados, assim como carrapatos *D. variabilis* e *Ixodes pacificus* (WALKER *et al.*, 2004). No Brasil, esta espécie foi recentemente descrita por meio de técnicas moleculares infectando veados campestre (MACHADO *et al.*, 2006)

Isolados de *E. chaffeensis* têm sido obtidos em cultivo primário usando células de histiocitoma canino (DH82) e, menos frequentemente, fibroblastos de pulmão embriônico humano (HEL 299). *In vitro*, *E. chaffeensis* tem sido adaptada para crescer em várias outras linhagens celulares, incluindo células endoteliais microvasculares humana (HCMEC-1), células do macaco verde africano (VERO), células do carcinoma epitelíóide cervical humano (HeLa), células leucêmicas monocíticas humanas (THP-1), células de embrião de camundongo, entre outras (PADDOCK & CHILDS, 2003).

Em hospedeiros vertebrados, *E. chaffeensis* infecta predominantemente monócitos, no entanto outras células sanguíneas, como linfócitos, já foram encontradas infectadas.

Infecção por *E. chaffeensis* resulta em profundas mudanças na transcrição de genes da célula hospedeira codificando proteínas envolvidas na biossíntese e metabolismo, transporte de canais iônicos, regulação da diferenciação celular, transdução de sinais, inflamação e tráfego de membranas. Do ponto de vista da patogênese, a mais importante mudança é a sub-regulação do sistema imune inato e o ciclo celular diferencialmente regulado (ZHANG *et al.*, 2004).

Sobrevivência de *E. chaffeensis* dentro do macrófago depende da sua habilidade em inibir a fusão do lisossomo com o fagossomo. Isto é conseguido pela inibição do amadurecimento do endossomo precoce no qual a bactéria reside dentro da célula. O mecanismo pelo qual *E. chaffeensis* inibi a maturação deste endossomo ainda não é entendido

(ZHANG *et al.*, 2004). Além disso, a sobrevivência de *E. chaffeensis* dentro da célula é influenciada por vias bioquímicas complexas envolvendo a aquisição de ferro (RIKIHISA *et al.*, 2000).

Outra estratégia usada por *E. chaffeensis* para se manter dentro da célula hospedeira é a inibição da apoptose. Apoptose é um mecanismo inato da defesa do hospedeiro usado para impedir a proliferação da bactéria internalizada. *E. chaffeensis* induz a produção de inibidores de apoptose tais como o NF- κ B, BCL2A1, BIRC3, IER3 e MCL1 e inativa alguns antagonistas destes inibidores (ZHANG *et al.*, 2004).

2.3.3.2 *Ehrlichia ruminantium*

Ehrlichia ruminantium é o agente causador da *heartwater*, uma doença de ruminantes domésticos e silvestres que causa grandes perdas econômicas na África. Essa bactéria é transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*.

O genoma circular de *E. ruminantium* possui 1,5 Mb e como os genomas de muitos outros patógenos endosimbiontes e intracelulares, apresenta um baixo conteúdo G+C (COLLINS *et al.*, 2006).

O genoma inclui 920 sequências codificantes das quais 32 provavelmente representam pseudogenes. Uma característica marcante do genoma desta bactéria é o grande número de seqüências repetitivas, constituindo cerca de 8,3% do cromossomo. A maioria dos pseudogenes de *E. ruminantium* parece ser produtos de eventos de duplicação. Em adição à geração de pseudogenes, duplicações podem permitir a formação de novos genes. A duplicação ativa de seqüências repetidas *in tandem* parece ir contra a evolução redutiva, e isso pode ser um mecanismo alternativo para adaptação do hospedeiro por aumentar a diversidade antigênica (COLLINS *et al.*, 2006).

O sequenciamento do genoma desta bactéria revelou a presença de vias metabólicas muito semelhantes ao descrito para *E. canis*.

2.3.3.3 *Ehrlichia muris*

Em 1983, um agente infeccioso denominado de cepa AS145^T foi isolado de baço de camundongos selvagens no Japão. Em 1995, Wen *et al.*

classificaram essa cepa como uma nova espécie de *Ehrlichia*, denominando-a *Ehrlichia muris*. Este organismo pode estabelecer infecções quando injetado intraperitonealmente e causar sinais clínicos de doença severa em camundongos de laboratório, incluindo esplenomegalia e linfadenopatia (WEN *et al.*, 1995).

Sorologicamente, *E. muris* reage cruzado com *E. chaffeensis* e *E. canis*. A seqüência do gene rRNA 16S desta bactéria é similar 97,9% à *E. chaffeensis*, 97,5% à *E. ewingii*, 96,9% à *E. canis* e 96,7% similar à *E. ruminantium* (WEN *et al.*, 1995).

Dados epidemiológicos de sorologia sugerem a exposição à *E. muris* ou outra espécie relacionada em humanos e vários animais selvagens no Japão (KAHAWARA *et al.*, 1999).

Esta ehrlichia vem sendo muito utilizada em modelo murino para estudos de patogênese e imunidade de infecções erliquiais.

2.4. Imunidade

Avaliação crítica dos mecanismos de patogênese e imunidade requereu o desenvolvimento de modelos animais apropriados (WALKER *et al.*, 2004).

Infecção por *E. chaffeensis* em camundongos *knockout* para o gene do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II e em camundongos *knockout* para receptores toll-like 4 resultaram em infecções persistentes, sugerindo o papel das células T CD4 e da ativação da imunidade inata inicial dependente dos receptores toll-like 4 (GANTA *et al.*, 2002).

A característica mais marcante da infecção por *E. chaffeensis* é a repressão de citocinas da célula hospedeira que modulam a imunidade adaptativa e inata a bactérias intracelulares. *E. chaffeensis* evita estimulação da produção de IL-12 e reprime a produção de IL-15 e IL-18. Essas citocinas desempenham um papel fundamental na estimulação de células *natural killer* (NK) e células T auxiliares 1 para produzirem interferon- γ (IFN- γ) que ativa macrófagos para destruírem bactérias fagocitadas. IL-12 e IL-15 também ativam células NK e linfócitos T citotóxicos para destruírem células infectadas com bactérias intracelulares. Assim, a repressão de IL-12, IL-15 e

IL-18 ajudam *E. chaffeensis* a evadir da resposta imune do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2004).

Ehrlichia chaffeensis inibe a via JAK-STAT. JAK1 e STAT1 são reprimidos no estágio precoce da infecção. Essa via tem um papel fundamental na sinalização de citocinas. Assim, esta bactéria pode inibir a ativação de macrófagos por interferons e interleucinas por sub-regular a via JAK-STAT (ZHANG *et al.*, 2004).

Adaptação do patógeno ao hospedeiro, especialmente em infecções persistentes, indica que o organismo tem mecanismos que o permitem evadirem da defesa do hospedeiro. Provavelmente, estes mecanismos estão relacionados à redução na resposta imune inata e adaptativa, como por exemplo, pela alteração da arquitetura da superfície e/ou expressão diferencial de variantes de proteínas. *Ehrlichia* spp. perde peptidoglicano e lipossacarídeos que são os principais padrões moleculares associados a patógenos encontrados na parede celular de bactérias gram-negativas (MAVROMATIS *et al.* 2006). Esta condição sugere que parede celular de células erliquiais tem diferenças estruturais e na composição e assim não podem ser reconhecidas pelos receptores de padrões moleculares associados a patógenos tais como os receptores Toll-like 2 e 4 (LIN & RIKIHISA, 2004).

O entendimento da imunidade do hospedeiro a infecções erliquiais é dificultado pela falta de um modelo animal imunocompetente. A utilização da nova espécie de *Ehrlichia*, denominada de IOE, resolveu em parte esse problema (BITSAKTSIS *et al.*, 2004). Ao contrário de *E. chaffeensis*, IOE causa doença fatal em camundongos imunocompetentes (SHIBATA *et al.*, 2000).

Bitsaktsis *et al.* (2004) utilizaram IOE para estudar o papel da imunidade celular durante infecções erliquiais. Estes autores observaram que o co-receptor CD4 é crítico para a defesa do hospedeiro diante da infecção erliquial. Além disso, estes autores demonstram que células T CD4 de camundongos infectados com IOE proliferam em resposta a antígenos IOE e secretam citocinas tipo I que são essenciais para a defesa do hospedeiro. O provável papel das células T CD4 durante a infecção por IOE é induzir, via citocinas inflamatórias, a produção de espécies reativas de

oxigênio que podem ser responsáveis pela morte das ehrlichias intracelulares dentro de macrófagos. Com este estudo, os autores puderam sugerir que os mecanismos imunes clássicos envolvendo ativação de macrófagos por células T CD4 Th1 são relevantes durante a infecção erliquial.

Alguns estudos indicam que a resposta imune tipo Th1, caracterizada pela secreção de INF- γ , TNF- α e IL-2, conduzindo a geração da imunidade celular, é o componente predominante da resposta imune a infecções erliquial (HARRUS *et al.* 1999). Na ausência da imunidade celular, a resposta de anticorpos desempenha também um papel significativo na defesa do hospedeiro durante infecções erliquiais (SHU-YI LI *et al.*, 2001).

Em contraste a camundongos e humanos, receptores MCH classe II estão presentes em quase todos os linfócitos caninos (DOXIADES *et al.*, 1986). HARRUS *et al.* (2003) mostraram que infecção de células DH82 com *E. canis* sub-regula os receptores MHC classe II, sugerindo que a apresentação de organismos erliquiais a células T CD4 pode ser fortemente afetada. Possivelmente, isto é um mecanismo para sobrevivência, persistência e evasão de *E. canis* do sistema imune.

2.5. Carrapatos vetores

Artrópodes pertencentes à Classe Arachnida, os carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios, parasitando vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Os mesmos podem permanecer fixados à pele do hospedeiro por dias ou semanas, secretando uma saliva que impede a coagulação sanguínea e as reações de defesa do organismo no local de fixação. A saliva possui substâncias vasoativas, que induzem a vasodilatação local, facilitando a ingestão de sangue (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Carrapatos transmitem todas as espécies de *Ehrlichia*, mas não ocorre transmissão transovariana em carrapatos para as espécies investigadas (DUMLER *et al.*, 2001). Um *cluster* ortólogo contendo um domínio protéico aldolase classe II está ausente em *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.. A perda deste domínio protéico pode impedir a transmissão transovariana no vetor artrópode (HOTTOP *et al.*, 2006).

Amblyomma americanum está distribuído nas partes leste e central dos Estados Unidos bem como em partes da América Central e do Sul (ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999). Este carrapato é o principal vetor de *E. chaffeensis* e *E. ewingii* nos Estados Unidos. Apesar das suspeitas de infecções humanas por *E. chaffeensis* em Portugal e Espanha (MORAIS *et al.*, 1991; SAZ *et al.*, 1994), espécies de *Amblyomma* não estão presentes na Península Ibérica, sugerindo que outras espécies de carrapatos devem estar envolvidas na transmissão de *E. chaffeensis* nesta região (ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999).

Como já mencionado, foram relatados casos sorológicos por *E. chaffeensis* em humanos no Brasil. Além disso, Machado *et al.*, (2006) detectaram molecularmente a presença desta bactéria em veado campestre brasileiro. Como a espécie *A. americanum* não está presente no Brasil, mais estudos se fazem necessários para a identificação dos carrapatos vetores de *E. chaffeensis* neste país.

Rhipicephalus sanguineus são provavelmente os mais amplamente distribuídos de todos os carrapatos. O parasitismo humano por este carrapato é raro e ocorre ocasionalmente na região Mediterrânea, América Central e muito raramente nos Estados Unidos. O parasitismo humano por *R. sanguineus* foi descrito no Brasil por Dantas-Torres *et al.* (2006).

Acreditava-se que somente carrapatos expostos a *E. canis* durante estádios imaturos podiam transmitir transtadialmente o patógeno entre cães. Contudo, Bremer *et al.* (2005) relataram que machos de *R. sanguineus* eram capazes de transmitir essa bactéria intraestadialmente e transtadialmente sob condições experimentais em que fêmeas de carrapato estavam ausentes, indicando, assim, que a cópula não é necessária para a aquisição e a transmissão do patógeno pelo macho.

Ehrlichia canis foi detectada em número similar de carrapatos antes e após a alimentação. A detecção de *E. canis* em carrapatos machos após terem se alimentado e transmitirem a bactéria ao cão hospedeiro, sugere que estes carrapatos podem ser capazes de transmitir o patógeno a hospedeiros adicionais (BREMER *et al.*, 2005). Carrapatos machos *Dermacentor andersoni*, transmissor de *A. marginale*, permaneceram capazes de transmitir essa bactéria a no mínimo cinco hospedeiros diferentes (KOCAN

et al., 1992). A ocorrência deste fenômeno com *E. canis* necessita de investigação.

2.6. Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose sem o auxílio laboratorial é quase impossível já que os sinais e sintomas da doença são similares a muitas outras doenças infecciosas. A dificuldade de se estabelecer o diagnóstico de infecções riquetsiais humanas por métodos microbiológicos de rotina cria a falsa idéia de que infecções por *Rickettsia* e *Ehrlichia* são raras e sem importância (WALKER & DUMLER, 1996).

O entendimento dos sinais clínicos, a anamnese e a epidemiologia da doença são cruciais para direcionar os testes requeridos para diagnóstico da erliquiose e a interpretação dos resultados destes testes. Testes da rotina clínica laboratorial incluem baixa contagem de células brancas sanguíneas, baixa contagem de plaquetas, elevados níveis de enzimas hepáticas e exames citopatológicos. Os organismos podem ser demonstrados em esfregaço sanguíneo por coloração com Diff-Quik ou Giemsa (CDC, 2000).

O diagnóstico preciso da erliquiose é importante para diferenciá-la de outras doenças, para o suporte da vigilância sanitária e para os estudos da patogênese. Os métodos de diagnóstico de infecções erliquiais incluem sorologia, isolamento do agente em cultura de células, visualização das mórulas por coloração e técnicas moleculares.

Vários testes sorológicos estão disponíveis para diagnosticar a erliquiose. Dentre eles, reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), *dot-blot* ELISA e *Western blotting*. Testes sorológicos são os mais usados no diagnóstico da erliquiose, mas reações cruzadas entre organismos relacionados ocorrem, levando a falsos diagnósticos (PAROLA & RAOULT, 2001). Além disso, o período pelo qual os anticorpos anti-erliquiais persistem no organismo é pouco definido e o nível de anticorpos na fase inicial da doença pode ser baixo para ser detectado (CDC, 2000).

Mórulas têm sido identificadas em esfregaços de sangue periférico, preparação da camada de células brancas e aspirados de medula óssea por vários tipos de coloração como Diff-Quick, Giemsa, Leishman e Wright. Embora esta técnica ofereça o método mais rápido de diagnóstico, ela é

considerada insensível e raramente confirmatória na clínica prática (PADDOCK & CHILDS, 2003).

O isolamento é um dos melhores métodos para diagnóstico, pois é sensível e específico. Entretanto, este método é demorado e requer um nível de experiência técnica que geralmente não é encontrado na maioria dos laboratórios, dificultando o seu uso como diagnóstico de rotina (BELL & PATEL, 2005).

A PCR e o seqüenciamento têm sido também utilizados para a detecção de agentes erliquiais (LA SCOLA & RAOULT, 1997). A PCR é sensível e específica, uma vez que torna possível a identificação da presença de DNA de bactérias tão fastidiosas mesmo em amostras de culturas negativas e, diretamente, de amostras clínicas coletadas de pacientes com suspeita de infecção. Uma das desvantagens dessa técnica é que sua sensibilidade é influenciada pela amostra. Durante a fase crônica da doença, por exemplo, a sensibilidade da PCR em amostras sangüíneas pode diminuir devido à baixa presença do agente. Além disso, a não-padronização da técnica entre os laboratórios e a ausência de um controle de qualidade rigoroso pode resultar tanto em resultados falso-positivos como em falso-negativos. A seqüência do gene que codifica o rRNA 16S é a mais freqüentemente usada para a identificação de *Ehrlichia*.

2.7. Tratamento

Testes de susceptibilidade *in vitro* têm mostrado que *Ehrlichia* é resistente à maioria das classes de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, penicilinas, macrolídeos e cetoalídeos e drogas contendo sulfas. Experiências clínicas reforçam estes resultados e indicam que cefalosporinas são também ineficazes (PADDOCK & CHILDS, 2003).

Ehrlichia é susceptível a tetraciclina e seus derivados. Estes antibióticos de amplo espectro agem inibindo a síntese proteica de várias espécies bacterianas por meio da ligação reversível à subunidade 30S ribossomal, impedindo a adição de novos aminoácidos durante a formação da cadeia peptídica (PADDOCK & CHILDS, 2003).

Dentro dessa classe de antibiótico, a doxiciclina é o principal medicamento utilizado no tratamento das erliquioses.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Detectar, molecularmente, *Ehrlichia* em populações de cães e gatos em Viçosa, estado de Minas Gerais.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Identificar por *nested*-PCR espécie-específico a presença de *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii* na população em estudo;

3.2.2. Relacionar a presença de *Ehrlichia* com os resultados de hemograma completo dos animais em estudo;

3.2.3. Confirmar, por seqüenciamento, produtos da amplificação espécie-específica de *Ehrlichia* e analisá-los filogeneticamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material a ser analisado

Foram analisadas 100 amostras de sangue de cães e 15 amostras de sangue de gatos, coletadas em EDTA, encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, MG, para a realização de exames, no período de 09/04/07 a 14/05/07. Estes animais foram inicialmente atendidos no setor de Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário com motivos distintos para consulta.

Com um analisador hematológico (Beckman Coulter ACT 8 Haematology Analyzer) foram realizadas as medidas dos seguintes parâmetros hematológicos: células brancas sanguíneas (WBC), células vermelhas sanguíneas (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e plaquetas (PLT).

Os esfregaços sanguíneos corados com o kit *Instant Prov* (Newprov) foram analisados por microscopia óptica para a contagem diferencial de leucócitos. Como parte da rotina do Laboratório de Análises Clínicas/DVT/UFV, para os animais que chegassem com suspeita de infecção por algum hematozoário (dentre eles *Ehrlichia*), ou que apresentassem um número muito baixo de plaquetas, as lâminas eram analisadas quanto à presença destes organismos nas células sanguíneas.

O teor de proteína total no plasma foi determinado por refratometria.

4.1.1. Caracterização da população de cães

Os motivos que levaram ao pedido dos exames para as 100 cães que chegaram ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário/UFV foram (Figura 2A): a esclarecer (41), avaliação pré-cirúrgica ou pré-anestésica (22), suspeita de infecção por erliquiose (8), suspeita de infecção viral por cinomose ou parvovirose (8), tumor venéreo transmissível (TVT) ou aplicação de vincristina (3), intoxicação ou envenenamento (3), traqueobronquite (3), avaliação para doação (2), gastroenterite hemorrágica

(2), flegmão (1), cistite ou cálculo renal (1), endocardiose (1), neoplasia esplênica (1), prenhez (1), raquitismo (1), verminose (1) e hiperplasia prostática (1).

Os animais pertenciam às seguintes raças (Figura 2B): sem raça determinada (SRD) (40), poodle (13), pinsher (11), boxer (4), cocker (4), rottweiler (4), teckel (3), lhasa apso (2), pastor belga (2), pequinês (2), pitbull (2), schnauzer (2), yorkshire (2), beagle (1), bichon frise (1), border collie (1), chow chow (1), doberman (1), dog alemão (1), fila (1) e labrador (1).

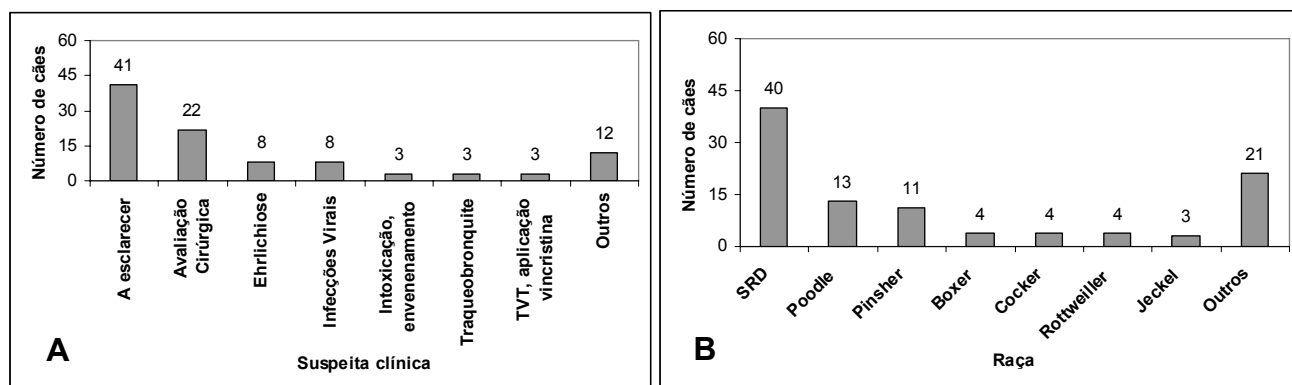


Figura 2. A. Motivo para a realização de exames no Laboratório de Análises Clínicas/DVT, B. Raça dos animais.

A idade dos animais variou de quatro meses a 18 anos. Classificando-os em grupos de acordo com a faixa etária tem-se: 12 animais no grupo I (0 a 6 meses de idade), 10 animais no grupo II (6 a 12 meses de idade), 42 animais no grupo III (1 a 7 anos de idade) e 31 animais no grupo IV (idade maior que 7 anos). A idade de cinco animais não foi informada no momento do preenchimento das fichas clínicas. Dentre os 100 animais, 44 animais eram machos e 66 animais eram fêmeas.

4.1.2. Caracterização da população de gatos

Os gatos foram atendidos no Hospital Veterinário/DVT/UFV pelos seguintes motivos: pré-cirúrgico (9), a esclarecer (3), processo viral (2) e cistite (1). Treze gatos eram sem raça determinada (SRD) e dois eram da raça siamês. Sete animais eram fêmeas e oito eram machos. A idade dos animais variou de um a sete anos.

As etapas a seguir, com exceção da etapa 4.5.1, foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários/Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

4.2. Extração do DNA

O método de extração de DNA utilizado foi adaptado do protocolo de isolamento de DNA de alto peso molecular de células de mamíferos utilizando proteinase-K e fenol descrito por Sambrook *et al.* (1989).

A extração de DNA foi feita a partir do plasma e das células brancas. Para isso, os tubos com o sangue e EDTA foram deixados na geladeira por até 24 horas para a sedimentação das hemácias. O plasma e a camada de células brancas foram transferidos para um tubo de 1,5 mL. Estes tubos foram centrifugados a 8000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 150 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e foram adicionados 400 µL do tampão de extração (ver Apêndice). Os tubos foram agitados no vortéx e incubados a 37°C por 30 minutos sendo agitados a cada 10 minutos.

A seguir foram adicionados 20 µL de Proteinase K na concentração de 10 mg/mL e os tubos foram novamente incubados a 37°C por aproximadamente 1 h. Após este tempo, foram adicionados 500 µL de fenol tamponado. Os tubos foram agitados por inversão e centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo onde foram adicionados 225 µL de fenol tamponado e 225 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e novamente centrifugados a 10000 rpm por 12 minutos. Este último passo foi repetido mais uma vez. A fase aquosa foi então transferida para um tubo novo onde foram adicionados 500 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados por inversão e centrifugados a 10000 rpm por 12 minutos.

A fase aquosa foi transferida para um tubo novo sendo adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3,0 M (pH 5,2) e 1 volume de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e deixados a -20°C por 1-2 h para precipitação do DNA. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 8000

rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% e centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e após o *pellet* ter sido seco à temperatura ambiente, eles foram ressuspensos em 20 µL de água ultrapura autoclavada.

Para verificar a qualidade do DNA, 1 µL de cada amostra foi aplicado em gel de agarose 0,8%, corado em solução com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta.

4.3. Reação em Cadeia pela Polimerase

Para evitar o risco de contaminação visto ser a técnica da *nested-PCR* muito sensível, todas as reações de PCR foram realizadas em capela de fluxo laminar, previamente limpa com solução de hipoclorito de sódio 1%, água ultrapura e etanol 70%. Foram utilizadas somente ponteiras com filtro e as pipetas utilizadas eram limpas, antes de cada reação, com etanol 70%. Todo o material utilizado foi esterilizado, antes de cada reação, com luz ultravioleta por 15 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

As amostras de DNA foram testadas por *nested-PCR* para a presença de *E. canis* e *E. ewingii* com *primers* que amplificam uma região do gene 16S rRNA. Para a primeira reação foram utilizados os *primers* ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') que amplificam um fragmento de 478 pb de todas *Ehrlichia* spp. (DAWSON *et al.*, 1994, 1996). Para a segunda reação foram utilizados os *primers* ECAN5 (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') (DAWSON *et al.*, 1996 e MURPHY *et al.*, 1998) e HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') (ANDERSON *et al.*, 1992b, MURPHY *et al.*, 1998) para amplificação *E. canis*-específica ou os *primers* EE5 (5'-CAATTCCTTAAATAGTCTCTGACTATTAG-3') (KOCAN *et al.*, 2000) e HE3 para amplificação *E. ewingii*-específica. Estes *primers* amplificam uma região de 398 pb mais interna que a região amplificada pelos *primers* ECB/ECC.

As reações (25 µL) continham tampão PCR 1X; 0,5 µM de cada *primer*; 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA

Polimerase. Para a reação externa foram utilizados como molde 1,0 µL de DNA de cada amostra e para a reação *nested*, o molde foi 1,5 µL do produto da primeira reação.

Reações com os *primers* ECB e ECC consistiam de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos por uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. *Nested* reação com os *primers* espécie-específicos (ECAN5/HE3 e EE5/HE3) consistia de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por três minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por um minuto, seguidos de uma etapa de extensão final a 72°C por cinco minutos. As PCR foram realizadas no termociclador *Mini Cycler*TM (MJ Research).

Como controle positivo foi usado DNA purificado de *Ehrlichia canis*, cedido pelo Prof. Marcelo Bahia Labruna/USP e DNA de *Ehrlichia* sp. cedido pelo Dr. David H. Walker/UTMB/EUA. Como controle negativo para a primeira reação foi utilizado água ultrapura e para a *nested* reação foram utilizados 1,5 µL do produto do controle negativo da primeira reação.

Para a confirmação da presença de *E. ewingii* nas amostras positivas para esta espécie na *nested*-PCR, foi feita uma reação com os *primers* Dsb-321 (5' – TTGCAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA – 3') e Dsb-671-ew (5' – GCAGCTCCACCAATGAATGTATTTCCAA – 3') (DOYLE *et al.*, 2005). Estes *primers* amplificam uma porção de 374 pb do gene Dsb que codifica a enzima tio-disulfido oxidoreductase. A seqüência deste gene em *E. ewingii* é mais divergente das outras espécies de *Ehrlichia* que a seqüência do gene rRNA 16S.

A reação (25 µL) continha tampão PCR 1X, 0,5 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase e como molde foi utilizado 1 µL do DNA de cada amostra. As condições da reação foram: uma etapa de desnaturação a 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos das reações *nested* e das reações com os *primers* Dsb-321/Dsb-671-ew foram analisados em gel de agarose 1,2%, corados em

solução de brometo de etídeo e visualizados em transiluminador com luz ultravioleta.

4.4. Purificação dos produtos de PCR

Duas amostras de cães e uma amostra de gato que foram positivas para *E. canis* na *nested*-PCR, uma amostra de cão positiva para *E. ewingii* na *nested*-PCR e uma amostra de cão positiva para *E. ewingii* na reação com os *primers* Dsb-321/Dsb-671-ew foram purificadas para serem submetidas ao sequenciamento. Para a purificação foi utilizado o *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN), conforme a recomendação do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 1%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizados em transiluminador com luz ultravioleta.

4.5. Clonagem dos produtos de PCR purificados

4.5.1. Preparo de células competentes

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Infectologia Molecular Animal/BIOAGRO/UFV.

Células DH5 α foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido (ver Apêndice) e crescidas a 37°C por aproximadamente 16 h sob agitação (180 rpm). Após esta etapa, o inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB líquido e colocados novamente para crescer na mesma condição anterior até atingir OD= 0,6. As células foram então transferidas para tubos tipo Falcon e incubadas no gelo por 10 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados em centrifuga refrigerada (4°C) a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* cuidadosamente ressuspendido em 10 mL de CaCl₂ 0,1 M preparado em água ultrapura e filtrado em membrana de nitrocelulose com 0,22 μ m de poro. Os tubos foram deixados por 10 minutos no gelo e depois centrifugados a 4°C por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 2 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado. Foram adicionados 300 μ L de glicerol e foram feitas alíquotas de 100 μ L de células em tubos de 1,5 mL. As células foram estocadas a -80°C.

4.5.2. Transformação de células competentes

Para a clonagem dos produtos de PCR purificados foi utilizado o vetor de clonagem *pGEM T Easy Vector System* (Promega). A reação de ligação foi preparada conforme as instruções do fabricante e deixadas a 25°C por aproximadamente duas horas.

A reação de ligação foi transferida para um tubo com células DH5 α competentes previamente descongeladas no gelo. As células com a reação de ligação foram incubadas por 30 minutos no gelo. A seguir, as células foram incubadas a 42°C por 1 minuto e depois no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 μ L de meio LB líquido e as células foram colocadas sob agitação a 150 rpm por 1 h a 37°C. Após este tempo, 200 μ L das células foram plaqueadas em placas contendo meio LB sólido (ver Apêndice) com ampicilina (50 μ g/mL de meio) e 40 μ L de X-GAL (40 mg/mL).

As placas foram incubadas a 37°C por 16-20 horas.

4.5.3. Triagem das colônias recombinantes

A triagem das colônias recombinantes foi feita visualmente. As colônias brancas (recombinantes) que surgiram após a transformação foram transferidas para um tubo contendo 4 mL de meio LB líquido e ampicilina (50 μ g/mL de meio). Estes tubos foram mantidos a 37°C, sob agitação de 150 rpm, por 16-20 horas, para o crescimento das colônias.

4.6. Purificação dos plasmídeos recombinantes

Para a extração de DNA plasmidial, foi utilizado o protocolo: “Preparação de DNA plasmidial por lise alcalina com SDS: minipreparação” (SAMBROOK *et al.*, 1989), com algumas modificações.

Foram transferidos 1,5 mL da suspensão de bactérias para tubos novos e estes foram centrifugados por 2 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 200 μ L de Solução I (ver Apêndice) gelada. Os tubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e a seguir foram adicionados 200 μ L da Solução II (ver Apêndice). Os tubos foram incubados por 5 minutos no gelo e após este tempo foram adicionados 150 μ L da Solução III gelada (ver Apêndice). Os

tubos foram agitados por inversão e incubados por 5 minutos no gelo. O sobrenadante foi transferido para tubos novos onde foram adicionados 5 µL de RNase A (10 mg/mL). Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C. A seguir, foram adicionados 225 µL de fenol e 225 µL clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e repetiu-se este último passo. A fase aquosa, então, foi transferida para um tubo novo onde foram adicionados 550 µL de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e foram adicionados 550 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos suavemente e deixados a -20°C por 1 h. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% e os tubos centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e após o *pellet* ter sido seco à temperatura ambiente, eles foram ressuspensos em 20 µL de água ultrapura autoclavada.

O DNA plasmidial extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta.

4.7. Ensaio de restrição

Para confirmar a presença do inserto do tamanho esperado foi realizado um ensaio de restrição. A reação (20 µL) continha 1 µL do DNA plasmidial, tampão da enzima de restrição 1X, 1 U da enzima EcoRI e água ultrapura para completar o volume.

A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos e depois a 80°C por 5 minutos para inativação da enzima.

O ensaio da restrição foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta.

4.8. Sequenciamento e Análise das Sequências

Os plasmídeos contendo o inserto desejado foram submetidos ao sequenciamento no Núcleo de Análise de Genômica e Expressão Gênica

(NAGE) da Universidade Federal de Minas Gerais. O sequenciamento foi realizado com os *primers* universais M13F e M13R. As seqüências obtidas foram comparadas com correspondentes homólogas disponíveis no GenBank pelo aplicativo *Discontiguous Megablast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.9. Análise estatística

Para estabelecer uma relação entre os dados dos exames laboratoriais dos cães e infecção por *E. canis* foi utilizado o teste F para análise de variância sendo que a faixa etária dos animais foram considerados como blocos e portanto tiveram seu efeito eliminado. Para infecção por *E. ewingii* em cães e por *E. canis* em gatos, não foi possível realizar esta análise já que o número de amostras infectadas foi pequeno.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Detecção molecular de *Ehrlichia* em cães

A pesquisa de hematozoários nos esfregaços sanguíneos foi realizada para 19 animais e em apenas um esfregaço foi possível à visualização de mórulas típicas de *Ehrlichia* em monócitos (Figura 3).

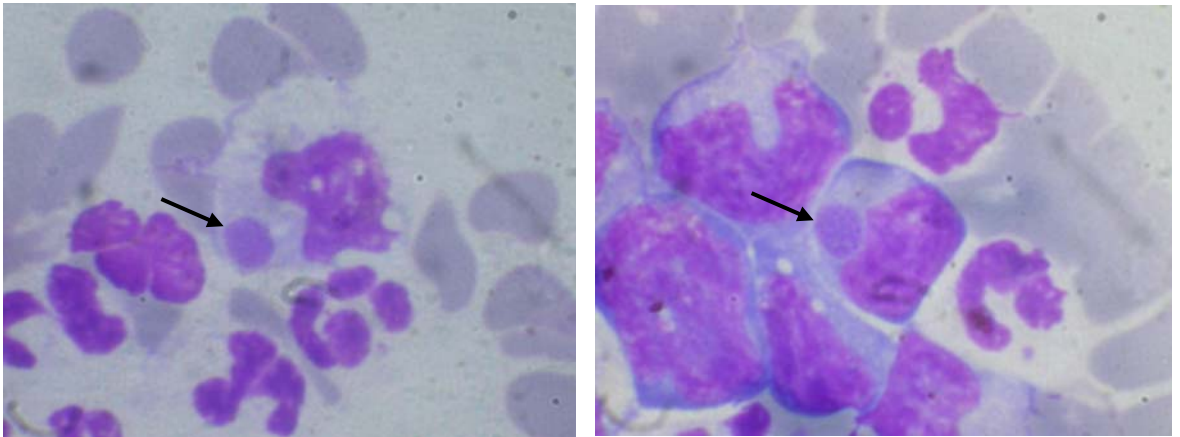


Figura 3. Fotografia de microscopia óptica de um esfregaço sanguíneo de cão, mostrando mórulas presentes em monócitos (setas). Aumento de 1000X. Câmera digital Nikon Coolpix 4500 acoplada a microscópio óptico Olympus CX 31.

5.1.1. Detecção de *Ehrlichia canis*

Por meio de *nested*-PCR foi possível detectar a presença de *E. canis* em 32 amostras (32%) (Figura 4). Dos oito animais que chegaram com suspeita de erliquiose, quatro foram positivos na *nested*-PCR. Como esperado, a amostra do animal em que mórulas presentes em monócitos foram visualizadas no esfregaço sanguíneo foi positiva na *nested*-PCR.

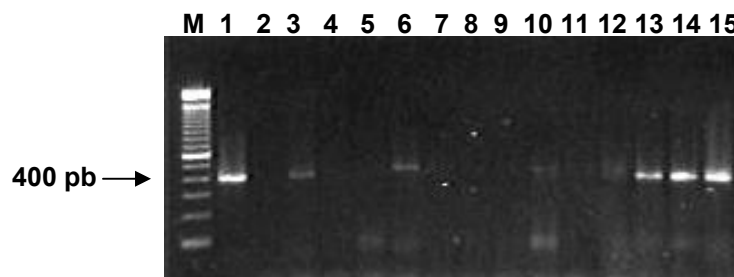


Figura 4. Gel de agarose 1,2%. Resultado da *nested*-PCR espécie específico com os *primers* ECAN5/HE3. M: *DNA Ladder* 100 pb. 1: Controle Positivo, 2: Controle Negativo, 3-15: Resultado da amplificação para algumas amostras.

Em um estudo prévio, semelhante a este, realizado por nosso grupo de trabalho, com 70 amostras de cães coletadas no período de fevereiro-março de 2006, foi encontrada uma taxa de infecção por *E. canis* de aproximadamente 37%. Em trabalhos realizados em outras regiões do Brasil, as taxas de infecção por *E. canis* em cães, determinadas por sorologia, variaram de 23% em Londrina/PR (TRAPP *et al.*, 2006) a 65,6% em Nanuque/MG (COSTA JR *et al.*, 2006).

Por métodos moleculares, as taxas de infecção variaram de 21,7% em Londrina/PR (DAGNONE *et al.*, 2003), 30,9% em Botucatu/SP (BULLA *et al.*, 2004) e 38,9% em Ribeirão Preto/SP (SANTOS *et al.*, 2007).

As taxas de infecção variaram de uma região para outra, sendo mais prevalente nas regiões mais quentes possivelmente devido à melhor adaptação do carrapato *R. sanguineus* ao clima quente e úmido. Entretanto, é importante ressaltar que diferenças nas taxas de infecções podem ser devido ao tamanho da população amostrada e aos diferentes métodos de detecção utilizados.

Dos 32 cães infectados por *E. canis*, 20 eram fêmeas (o que corresponde a 30,3% das fêmeas analisadas) e 12 eram machos (o que corresponde a 27,3% dos machos analisados). Os animais infectados foram das seguintes raças: SRD, poodle, boxer, cocker, pitbull, rottweiler, border collie, teckel, pequinês, pinscher, schnauzer. A maior taxa de infecção foi encontrada no grupo de animais pertencentes a faixa etária 6 a 12 meses (grupo II) com 40% desses animais infectados, seguidos por 34,15% dos animais do grupo III infectados, 29,03% dos animais do grupo IV e 25% dos animais do grupo I (Tabela 1).

Alguns trabalhos mostraram que não há relação entre a taxa de infecção por *Ehrlichia* com idade, sexo ou raça dos cães (WATANABE *et al.*, 2004, RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2005). No presente estudo, não foi possível analisar a relação da infecção por *E. canis* e a raça dos animais devido à grande diversidade de raças analisadas com um pequeno número de representantes para algumas delas (Tabela 1). Entretanto, concordando com os trabalhos citados acima, também não foi observada a relação entre as taxas de infecção por *E. canis* e idade e sexo dos animais.

Tabela 1. Diferenças na taxa de infecção por *E. canis* de acordo com raça, sexo e idade.

Critérios		Nº total de animais	Nº de animais infectados (%)
Raça	Border collie	1	1 (100%)
	Boxer	4	2 (50%)
	Cocker	4	2 (50%)
	Teckel	3	1 (33,3%)
	Pequinês	2	1 (50%)
	Pinscher	11	1 (9,1%)
	Pitbull	2	2 (100%)
	Poodle	13	3 (23,07%)
	Rottweiler	4	2 (50%)
	Schnauzer	2	1 (50%)
	SRD	40	16 (40%)
	Sexo	Fêmea	66
Macho		44	12 (27,3%)
Idade	0-6 meses (Grupo I)	12	3 (25,00%)
	6-12 meses (Grupo II)	10	4 (40,00%)
	1-7 anos (Grupo III)	41	14 (34,15%)
	> 7 anos (Grupo IV)	31	9 (29,03%)
	Não informada	5	2 (40%)

A maioria dos cães infectados por *E. canis* foram levados ao Hospital Veterinário para esclarecimento de alguma suspeita clínica (34,4%), seguidos por avaliação pré-cirúrgica (25%), erliquiose (12,5%), infecções virais (6,25%), aplicação vincristina/TVT (6,25%), intoxicação (6,25%), avaliação para doação (3,12%), endocardiose (3,12%), verminose (3,12%).

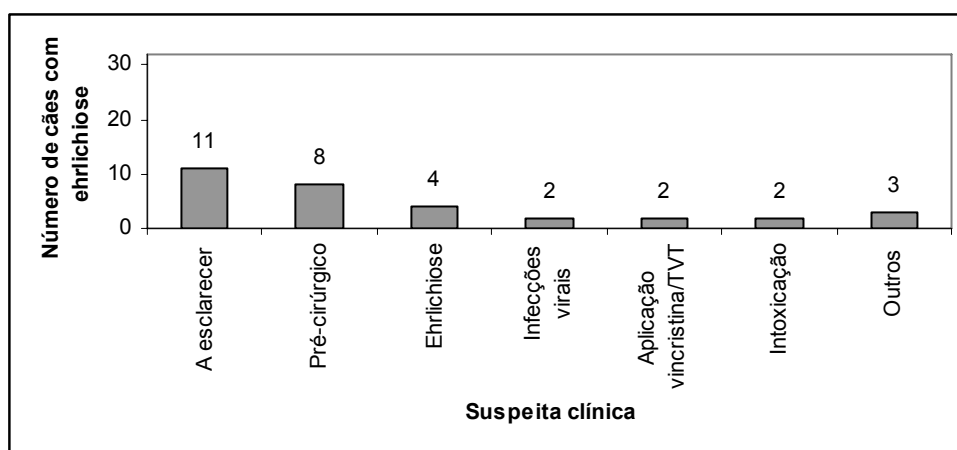


Figura 5. Número de cães com erliquiose dentro de cada suspeita clínica.

Analisando os parâmetros hematológicos e o teor de proteína plasmática, foi observado que houve diferença estatística quando comparado os valores dos animais infectados com os valores dos animais não infectados por *E. canis* para os seguintes parâmetros: número de hemácias, valor de hemoglobina e hematócrito ($P = 0,05$) e número de eosinófilos ($P = 0,10$) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvios padrão para os parâmetros analisados dos animais infectados e não infectados com *E. canis*.

Parâmetros	Valor médio para os animais não infectados (m ± SD)*	Valor médio para os animais infectados (m ± SD)	Valores normais (JAIN, 1993)
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	5,94 ± 1,25	5,18 ± 1,47 †	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/dL)	13,21 ± 3,12	11,84 ± 3,61 †	12 – 18
Hematócrito (%)	39,58 ± 8,88	35,01 ± 10,45 †	37 – 55
VGM (fL)	66,42 ± 4,19	67,77 ± 3,21	60 – 77
CHGM (%)	33,68 ± 1,96	33,51 ± 1,21	32 – 36
Leucócitos (/μL)	13815,38 ± 7438,21	14430,67 ± 8962,66	6000 – 17000
Eosinófilos (/μL)	801,55 ± 1008,98	488,93 ± 555,31 ‡	100 – 1250
Bastonetes (/μL)	730,31 ± 1930,17	759,07 ± 1328,42	0 – 300
Neutrófilos (/μL)	68,92 ± 14,15	72,60 ± 10,79	3000 – 11500
Linfócitos (/μL)	16,29 ± 12,75	14,10 ± 9,26	1000 – 4800
Monócitos (/μL)	685,63 ± 529,05	709,17 ± 621,28	150 – 1350
Plaquetas (/μL)	293276,92 ± 164407,13	251489,65 ± 165407,67	200000 – 500000
Proteína (g/dL)	7,09 ± 0,87	7,41 ± 1,26	5,5 – 7,5

*(m ± SD) = média ± desvio padrão

† Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

‡ Significativo a 10% probabilidade pelo teste F.

O número de hemácias, valor de hemoglobina e o hematócrito estão relacionados com a anemia. A anemia é um estado mórbido causada por diminuição da quantidade de hemoglobina circulante. Raramente a anemia é um distúrbio primário, aparecendo mais como manifestação secundária de uma doença em algum outro órgão ou sistema (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1998).

Os índices hematimétricos, volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM), são utilizados para a classificação das anemias. O VGM está relacionado ao tamanho das hemácias e quando este valor está abaixo, dentro ou acima dos limites normais, a anemia é classificada como microcítica, normocítica e macrocítica, respectivamente. Com o valor da CHGM as anemias podem ser classificadas em normôcrima, caso o valor esteja dentro dos limites normais ou em hipocrômica caso o valor esteja abaixo dos limites normais.

Dos 32 cães infectados com *E. canis*, 19 (59,4%) apresentaram anemia, sendo que para 18 (56,25%) animais a anemia era do tipo normocítica normocrômica. Anemia normocítica normocrômica ocorre devido

à depressão seletiva da eritropoiese em doenças crônicas (JAIN, 1993). Este resultado está de acordo com Harrus *et al.* (1997) que em um estudo avaliando 100 casos de erlichiose canina, encontraram anemia normocítica normocrômica, linfopenia e trombocitopenia como os principais achados hematológicos nos animais com a doença.

Dagnone *et al.* (2003) em um estudo com cães do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina/PR observaram que 14,3% dos cães com erliquiose eram anêmicos. Este valor é bem menor do que o valor encontrado no presente estudo. Entretanto, estes autores podem ter subestimado a verdadeira prevalência de erliquiose como causa de anemia já que consideraram cães anêmicos somente os que tinham o valor de hematócrito (HCT) menor que 22%, enquanto nós consideramos o valor descrito por Jain (1993) que é HCT < 37%.

A trombocitopenia, baixo número de plaquetas, é considerada um dos achados hematológicos mais comuns na erliquiose canina. Neste estudo, não foi observada diferença estatística quando a média do valor de plaquetas de cães não infectados foram comparadas com a média de cães infectados (P = 0,10). Foi observado que 43,7% (14) dos cães com erliquiose eram trombocitopênicos. Vários estudos analisaram a relação da trombocitopenia com a erliquiose no Brasil. Santos *et al.* (2007) em seus estudos observaram que 66,3% dos cães infectados por *E. canis* eram trombocitopênicos enquanto Dagnone *et al.* (2003) encontraram 71,4% (20/28) dos animais com erliquiose com trombocitopenia. Macieira *et al.* (2005), analisando uma população de cães trombocitopênicos do Rio de Janeiro/RJ, observaram que 26,8% destes animais estavam infectados com *E. canis*. Nos Estados Unidos, trombocitopenia foi encontrada em 77% (47/61) dos cães com erliquiose (FRANK & BREITSCHWERDT, 1999) e em Israel, onde a erliquiose é mais prevalente que nos Estados Unidos, 27% (17/63) dos cães com anticorpos para *E. canis* eram trombocitopênicos. No Japão, trombocitopenia foi a anormalidade hematológica mais comum em cães com erliquiose, ocorrendo em 36,7% dos cães que apresentavam anticorpos contra *E. canis* (WATANABE *et al.*, 2004).

Os mecanismos fisiopatológicos da trombocitopenia incluem menor produção, destruição ou utilização acelerada, distribuição anormal e

excessiva perda de plaquetas. No caso das infecções erliquiais os prováveis mecanismos fisiopatológicos da trombocitopenia são menor produção e utilização ou destruição acelerada das plaquetas (JAIN, 1993).

Não foi observada diferença estatística quando a média do valor de leucócitos de cães não infectados foram comparadas com a média de cães infectados com *E. canis* ($P = 0,10$). A contagem das células brancas sanguíneas (WBC) ou leucócitos constitui o leucograma. Valores maiores que a faixa considerada normal para a espécie caracteriza a leucocitose e valores menores que o de referência caracteriza a leucopenia. Apenas três (9,4%) animais com erliquiose apresentaram leucopenia e nove apresentaram leucocitose (28,1%).

O fato de tanto leucopenia como leucocitose poderem ser observados provavelmente seja devido aos vários estágios da infecção nos cães analisados. Na fase aguda a contagem de leucócitos é variável, na fase subclínica ocorre leucopenia e na fase crônica ocorre tanto leucopenia como leucocitose (ETTINGER & FELDMAN, 1992).

Os leucócitos compreendem três tipos: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e linfócitos. Os monócitos e os granulócitos estão relacionados com a resposta fagocítica, enquanto os linfócitos estão relacionados com o início e a execução da resposta imune.

Foi observada diferença significativa entre a média dos cães infectados quando comparadas com a média dos cães não infectados apenas para os valores absoluto (número total) e relativo (porcentagem em relação ao número total de leucócitos) dos eosinófilos ($P = 0,10$). Os cães infectados com *E. canis* apresentaram a média dos valores de eosinófilos menor que a média dos animais não infectados. Mesmo diferentes, estatisticamente, as médias desses valores caíram dentro da faixa considerada normal para os cães.

Considerando apenas os animais infectados, 34,4% (11/32) apresentaram eosinopenia, 28,1% (9/32) apresentaram linfopenia, 34,4% (11/32) apresentaram neutrofilia e 50% (16/32) apresentaram níveis elevados de bastonetes. A eosinopenia é a diminuição do número de eosinófilos circulantes e geralmente acompanha infecções agudas e reações inflamatórias. A linfopenia, caracterizada por diminuição dos linfócitos

circulantes, pode ocorrer em processos infecciosos graves e a neutrofilia, caracterizada pelo aumento de neutrófilos circulantes, pode ocorrer nas infecções agudas, na agudização de processos crônicos e na fase inicial de regeneração das anemias (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1998).

Dos 11 animais infectados com *E. canis* que apresentaram neutrofilia, todos apresentaram desvio à esquerda regenerativo. Os bastonetes são neutrófilos imaturos. O aumento deste tipo celular na circulação caracteriza o desvio à esquerda e ocorre quando a demanda funcional por neutrófilos aumenta nos tecidos. Este desvio à esquerda é classificado como regenerativo quando na neutrofilia o número de bastonetes é menor que o número de neutrófilos e degenerativa quando na neutrofilia o número de bastonetes é maior que o número de neutrófilos circulantes (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1998). O desvio à esquerda regenerativo é um indicativo da boa resposta do animal e ocorre quando a medula óssea tem tempo suficiente para responder à maior demanda de neutrófilos nos tecidos (JAIN, 1993).

Em relação aos níveis de proteína plasmática, 21,9% (7/32) dos animais infectados apresentaram hiperproteinemia e 6,2% (2/32) apresentaram hipoproteinemia. Não foi observada diferença estatística entre a média do teor de proteína plasmática dos animais infectados quando comparada com a média dos animais não infectados ($P = 0,10$) sendo que as médias dos dois grupos de animais estavam dentro da faixa normal. Um aumento nos níveis de proteína plasmática pode ocorrer em resposta a infecções crônicas como resultado do aumento de γ -globulinas, ou também devido a menor consumo de água e comida, comum nos animais doentes (JAIN, 1993).

Dois (6,25%) animais com erliquiose apresentaram pancitopenia que é a diminuição global do número de plaquetas, de leucócitos e dos eritrócitos. Provavelmente estes animais estavam na fase crônica da doença apresentando a pancitopenia devido ao comprometimento da medula óssea (DAGNONE *et al.*, 2001).

Seis (18,75%) animais infectados com *E. canis* não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros analisados. A ausência de sinais clínicos pode ser devido à coleta de sangue na fase inicial da doença, antes que os

sinais clínicos fossem desenvolvidos. Isto reforça a importância de um diagnóstico sensível que seja capaz de detectar a bactéria no início da infecção.

5.1.2. Detecção de *Ehrlichia ewingii*

Foram detectados por *nested*-PCR espécie-específico cinco cães infectados com *E. ewingii*. A reação de PCR com os *primers* Dsb-321 e Dsb-671-ew confirmou a presença desta bactéria nos cinco animais (Figura 6).

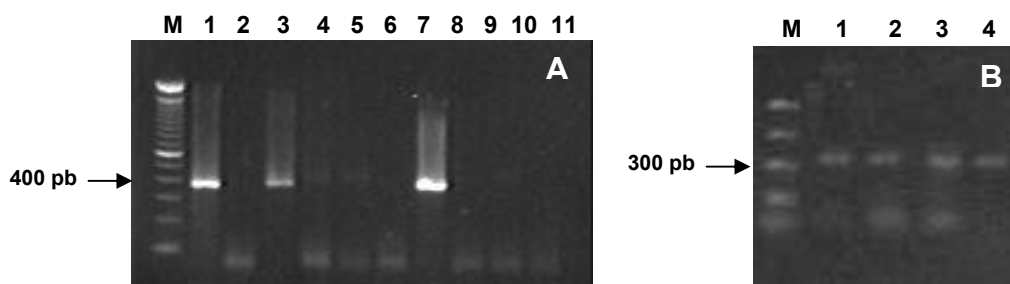


Figura 6. Gel de agarose 1,2%. **A.** Resultado da *nested*-PCR para *E. ewingii* com os *primers* EE5/HE3. M: *DNA Ladder* 100 pb, 1: Controle Positivo, 2: Controle Negativo, 3-11: Resultado da amplificação para algumas amostras. **B.** Resultado da PCR com os *primers* Dsb-321 e Dsb-671-ew. M: *PCR Marker*, 1-4: Resultado da amplificação de algumas amostras.

O presente estudo é o primeiro a fornecer evidência molecular de infecção canina provocada por outra espécie de *Ehrlichia* diferente de *E. canis* na América do Sul. Trapp *et al.* (2006) não excluíram a possibilidade de infecção por *E. ewingii* em um estudo de soroprevalência para detecção de babesiose e erliquiose canina, realizado em uma população de cães do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina/PR, já que alguns animais que foram positivos para *E. canis* nos testes sorológicos apresentaram claudicação, um sinal incomum na CME causada por *E. canis*, mas que ocorre frequentemente na erliquiose granulocítica canina causada por *E. ewingii*.

Dos cinco animais positivos para *E. ewingii*, quatro estavam coinfectados com *E. canis*. Com o aprimoramento das técnicas de diagnóstico, coinfeção com múltiplos organismos transmitidos por carrapatos em cães e humanos tem sido relatada com uma maior frequência. Suksawat *et al.* (2001) relataram dois casos, um na Venezuela e outro em Taiwan, de cães coinfectados com *E. canis*, *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) e *A. phagocytophila* (*Ehrlichia equi*). Em seus estudos

sorológicos, Trapp *et al.* (2006) observaram que 14% dos cães analisados soro-reagiram para *E. canis* e *Babesia vogeli* (um parasita que também é transmitido por *R. sanguineus*). Estes autores relataram ainda que anormalidades neurológicas foram mais freqüentes no grupo de animais que apresentaram anticorpos contra ambos os parasitas, levando-os a sugerirem que a coinfeção aumentou o risco de desenvolvimento de desordens neurológicas. Entretanto, não está claro ainda, como a coinfeção por múltiplos organismos transmitidos por carrapatos em animais ou humanos potencializa as manifestações clínicas ou complica o diagnóstico e tratamento da doença.

O cão infectado apenas com *E. ewingii* foi atendido no Hospital Veterinário/UFV para avaliação pré-cirúrgica. Este animal não era trombocitopênico, mas apresentou anemia severa do tipo microcítica e hipocrômica. Este tipo de anemia é resultante da falta de ferro, perda crônica de sangue ou ainda devido à infestação por parasitas hematofágicos, como por exemplo, carrapatos. Entretanto, a informação da ocorrência de infestação por carrapatos não foi obtida para nenhum animal analisado. O animal apresentou ainda leucocitose devido à neutrofilia e desvio à esquerda regenerativo.

Três animais infectados com as duas espécies de *Ehrlichia* analisadas apresentaram anemia normocítica normocrômica que é um achado hematológico comum em cães com erliquiose, seja ela monocítica ou granulocítica (HARRUS *et al.*, 1997; GOLDMAN *et al.*, 1998). Um destes animais apresentou também trombocitopenia e a sua suspeita clínica era neoplasia esplênica. Esplenomegalia é um mecanismo imunológico possivelmente envolvido na patogenia da erliquiose, que pode levar a trombocitopenia (DAGNONE *et al.*, 2001).

Um animal coinfectado com *E. canis* e *E. ewingii* não apresentou nenhuma anormalidade hematológica. A presença de cães assintomáticos infectados com *E. ewingii* sugerem que cães podem servir como reservatório da bactéria. Concordando com os resultados deste estudo, Liddell *et al.* (2003) também encontraram cães assintomáticos infectados com *E. ewingii* em Missouri/EUA. Esses resultados mostram a possibilidade de que infecções erliquiais crônicas em cães podem ser fontes para subseqüentes

infecções com *Ehrlichia* em humanos residentes na mesma área (LIDDELL *et al.*, 2003). A suspeita clínica deste animal era endocardiose. Isto pode estar de acordo com os estudos de Diniz (2006) que observou que cães infectados por *E. canis* apresentam maior risco para lesões miocárdicas, sendo ainda o grau de anemia correlacionado com o aumento do risco.

Em um estudo semelhante ao presente trabalho, realizado por Liddell *et al.* (2003) em Missouri, nos EUA, 88 cães foram testados por PCR e as taxas de infecção encontradas foram: 22,7% para *E. ewingii* e 1,1% para *E. chaffeensis*. Não foi detectado nenhum caso de infecção por *E. canis*.

No presente estudo, diferentemente do observado por Liddel *et al.* (2003), constatou-se que a maioria dos cães que apresentava erliquiose estava infectada com *E. canis*, demonstrando que *E. canis* é a principal causa de infecção erliquial na população em estudo. É importante ressaltar que a prevalência de *E. canis* é dependente da distribuição do vetor, o carrapato *R. sanguineus*, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SKOTARCZAK, 2003).

Na América do Norte, *E. ewingii* é transmitida, principalmente, por carrapatos *Amblyomma americanum*. Como esta espécie de carrapato não é comum na América do Sul, outras espécies deste ectoparasito devem estar envolvidas na transmissão de *E. ewingii* a cães no Brasil. Murphy *et al.* (1998) encontraram *R. sanguineus*, *A. americanum* e *Dermacentor variabilis* infectados com esta bactéria, sugerindo que estas espécies de carrapatos podem ser potenciais vetores para *E. ewingii*. Assim, mais estudos se fazem necessários para o melhor entendimento da ecologia de *E. ewingii* no Brasil.

5.2. Detecção molecular de *Ehrlichia* em gatos

Pela *nested*-PCR, três gatos foram positivos para *E. canis* e nenhum gato foi positivo para *E. ewingii*. Todos os gatos eram sem raça determinada. Dois eram machos e um era fêmea. A única anomariedade hematológica observada foi a trombocitopenia em um gato. Os níveis de proteínas dos três animais também foram normais. Os motivos que levaram estes animais ao Hospital Veterinário foram: avaliação pré-cirúrgica (2) e cistite (1).

Ortuño *et al.* (2005), em um estudo sorológico com gatos de Barcelona, Espanha, encontraram 42 gatos com anticorpos contra *E. canis*,

entretanto, somente sete animais apresentaram alguma manifestação clínica, sendo as manifestações gastrointestinais mais frequentemente observadas.

Devido ao pequeno número de casos reportados, a sintomatologia da infecção por *E. canis* em gatos tem se mostrado polimórfica e não específica. Os fatores de risco associados à sorologia positiva para *E. canis* em gatos foi estudada por Stubbs *et al.* (2000). Os gatos expostos à rua e as fêmeas foram considerados como mais sujeitos à infecção por *E. canis*. Não foi observada nenhuma associação com raça e idade.

Os gatos parecem ser menos predipostos que cães a doenças transmitidas por carrapatos. Os gatos podem ter resistência inata ou adaptação à infecção o que limita o desenvolvimento da doença ou compromete a transmissão dos agentes infecciosos dos carrapatos aos gatos (SHAW *et al.*, 2001). Pouco se conhece sobre as espécies de carrapatos capazes de infestar e transmitir doenças infecciosas aos gatos. Em regiões quentes, foram encontrados gatos infestados com *Dermacentor* spp., *R. sanguineus* e *Haemaphysalis* spp. (SHAW *et al.*, 2001). Assim, é possível que *R. sanguineus* seja o vetor de *E. canis* em gatos no Brasil, já que este carrapato ocorre amplamente no país.

Os gatos também se mostraram susceptíveis à infecção por *Rickettsia rickettsii* (GREENE & BREITSCHWERDT, 1998, citados por SHAW *et al.*, 2001). *Rickettsia rickettsii* é o agente causador da Febre Maculosa Brasileira, a mais prevalente doença riquetsial no Brasil (LEMOS *et al.*, 2001). Entretanto, ainda não se conhece a participação dos gatos na epidemiologia desta doença.

Este é o primeiro relato de detecção molecular de *E. canis* em gatos na América do Sul. Filoni *et al.* (2006) relataram a primeira evidência sorológica de *E. canis* em felino silvestre no Brasil. Um puma da região do Pantanal apresentou alto título de anticorpos contra *E. canis* pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFA). Segundo os autores, carrapatos são comuns na área onde o puma foi capturado e várias espécies de carrapatos tais como *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Ixodes aragoi* foram previamente reportadas em puma por Labruna *et al.* (2005). Além disso,

Santarém *et al.* (2005) relataram inclusões plaquetárias semelhantes à *Anaplasma (Ehrlichia) platys* em um gato atendido no Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo.

A rota de transmissão das doenças erliquiais nos gatos ainda não é conhecida. Entretanto, o aumento dos relatos de casos de infecções por *Ehrlichia* nestes animais reforça a necessidade de maiores estudos para definir quais as espécies de *Ehrlichia* infectam gatos e qual a participação dos gatos na epidemiologia das erliquioses.

5.3 Análise das Sequências

Foram obtidas duas seqüências de *E. canis* a partir de cães e uma seqüência de *E. canis* a partir de gatos. Não foi obtido sucesso no sequenciamento dos plasmídeos obtidos para *E. ewingii*.

As seqüências obtidas neste estudo mostraram aproximadamente 99- a 100% de similaridade com as demais linhagens de *E. canis* depositadas no GenBank, incluindo a seqüência de *E. canis* obtida a partir de gatos. É observado que as seqüências do gene rRNA 16S para *E. canis* apresentam 99,4-100% de similaridade e não apresentam divergência de acordo com a distribuição geográfica (SIARKOU *et al.*, 2007).

Uma seqüência de *E. canis* obtida a partir de cães e a seqüência de *E. canis* obtida a partir de gato foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acessos: EU567024 e EU567025, respectivamente.

6. CONCLUSÃO

Diante de todos os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- 1) *Ehrlichia canis* é um patógeno comum em cães de Viçosa/MG.
- 2) Os achados hematológicos mais comuns em cães infectados por *E. canis* foram anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, eosinopenia e neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo. Entretanto, esses achados não são exclusivos da erliquiose canina.
- 3) *Ehrlichia ewingii* foi detectada em alguns cães analisados. Este é o primeiro relato desta bactéria infectando cães na América do Sul.
- 4) *Ehrlichia canis* foi detectada em alguns gatos analisados. Este é o primeiro relato de detecção molecular de *E. canis* infectando gatos na América do Sul.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para dar continuidade a este trabalho é proposto:

- ✓ Identificar as espécies de ectoparasitos infestando cães e gatos de Viçosa/MG;
- ✓ Investigar as espécies de *Ehrlichia* circulantes nestes ectoparasitos a fim de determinar os prováveis vetores de *Ehrlichia ewingii* a cães e possivelmente a humanos e de espécies de *Ehrlichia* a gatos;
- ✓ Analisar a presença de *Ehrlichia* em animais silvestres da região de Viçosa/MG, a fim de conhecer melhor a história natural e epidemiologia da erliquiose no município.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.M., CAVALCANTE, G.T., PINTER, A., GENNARI, S.M., CAMARGO, L.M.A., LABRUNA, M.B. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 44: 126-132.
- AGUIRRE, E., TESOURO, M.A., AMUSATEGUI, I., RODRIGUEZ-FRANCO, F., SAINZ, A. 2004. Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and Polymerase Chain Reaction technique. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026: 103–105.
- ANDERSON, B.E., GREENE, C.E., JONES, D.C., DAWSON, J.E. 1992a. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 299-302.
- ANDERSON, B.E., SUMNER, J.W., DAWSON, J.E., TZIANABOS, T., GREENE, C.R., OLSON, J.G., FISHBEIN, D.B., OLSEN-RASMUSSEN, M., HOLLOWAY, B.P., GEORGE, E.H. 1992b. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 775–780.
- ANDERSSON, S.G., ZOMORODIPOUR, A., ANDERSSON, J.O., SICHERITZ-PONTÉN, T., ALSMARK, U.C., PODOWSKI, R.M., NÄSLUND, A.K., ERIKSSON, A.S., WINKLER, H.H., KURLAND, C.G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396: 133–140.
- BAKKEN, J.S., DUMLER, J.S. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 554–560.
- BEKKER, C.P., DE VOS, S., TAOUFIK, A., SPARAGANO, O.A., JONGEJAN, F. 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Veterinary Microbiology*, 89: 223–238.

- BELONGIA, E.A., REED, K.D., MITCHELL, P.D., CHYOU, P.H., MUELLER-RIZNER, N., FINKEL, M.F., SCHRIEFER, M.E. 1999. Clinical and epidemiological features of early Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin. *Clinical Infectious Diseases*, 29:1472-1477.
- BITSAKTSIS, C., HUNTINGTON, J., WINSLOW, G. 2004. Production of IFN- γ by CD4 T Cells Is Essential for Resolving *Ehrlichia* Infection. *The Journal of Immunology*, 172: 6894-6901.
- BJOERSDORFF, A., SVENDENIUS, L., OWENS, J.H., MASSUNG, R.F. 1999. Feline granulocytic ehrlichiosis - a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *Journal of Small Animal Practice*, 40: 20-24.
- BONI, M., DAVOUST, B., DRANCOURT, M., LOUIS, F.J., ANDRE-FONATINE, G., JOUAN, A., PARZY, D., BIRTLES, R. 1997. Rats et chats errants: enquête épidémiologique en milieu urbain. *Bulletin bimestriel de la Société vétérinaire pratique de France*, 81: 441-457.
- BREITSCHWERDT, E.B., ABRAMS-OGG, A.C., LAPPIN, M.R., BIENZLE, D., HANCOCK, S.I., COWAN, S.M., CLOOTEN, J.K., HEGARTY, B.C., HAWKINS, E.C. 2002. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16: 642-649.
- BREMER, W.G., SCHAEFER, J.J., WAGNER, E.R., EWINGI, S.A., RIKIHISA, Y., NEEDHAM, G.R., JITTAPALAPONG, S., MOORE, D.L., STICK, R.W. 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 131: 95-105.
- BULLA, C., TAKAHIRA, R.K., ARAÚJO, J.P., TRINCA, L.A., LOPES, R.S., WIEDMEYER, C.E., 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*, 35: 141-146.
- BULLER, R.S., ARENS, M., HMIEL, S.P., PADDOCK, C.D., SUMNER, J.W., RIKIHISA, Y., UNVER, A., GAUDREAU-KEENER, M., MANIAN, F.A., LIDDELL, A.M., SCHMULEWITZ, N., STORCH, G.A. 1999. *Ehrlichia*

ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine*, 341:148-155.

CALIC, S.B., GALVÃO, M.A.M., BACELLAR, F., ROCHA, C.M.B.M., MAFRA, C.L., LEITE, R.C., WALKER, D.H. 2004. Human ehrlichiosis in Brazil: First suspect cases. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8: 259-262.

CASES, I., DE LORENZO, V., OUZOUNIS, C.A. 2003. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends in Microbiology*. 11: 248-253.

CDC. Center for Control and Prevention of Diseases. Human Ehrlichiosis in the United States. 2000. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/ehrlichia>

COLLINS, N.E., LIEBENBERG, J., DE VILLIERS, E.P., BRAYTON, K.A., LOUW, E., PRETORIUS, A., FABER, F.E., VAN HEERDEN, H., JOSEMANS, A., VAN KLEEF, M., STEYN, H.C., VAN STRIJP, M.F., ZWEYGARH, E., JONGEJAN, F., MAILARD, J.C., BERTHIER, D., BOTHA, M., JOUBERT, F., CORTON, C.H., THOMSON, N.R., ALLSOPP, M.T., ALLSOPP, B.A. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proceeding of National Academy of Science United Society of American*. 102, 838-843.

COSTA JR., L.M., REMBECK, K., RIBEIRO, M.F.B., BEELITZ, P., PFISTER, K., PASSOS, L.M.F. 2006. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *The Veterinary Journal*, 174: 673-676.

COSTA, P.S.G., BRIGATTE, M.E., GRECO, D.B. 2005. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 853-859.

COSTA, P.S.G., VALLE, L.M.C., BRIGATTE, M.E., GRECO, D.B. 2006. More about human monocitotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence

of nine new cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10: 7-10.

DAGNONE, A.S., DE MORAIS, H.A.S., VIDOTTO, M.C., JOJIMA, F.S., VIDOTTO, O. 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. *Veterinary Parasitology*, 117: 285-290.

DAGNONE, A.S., DE MORAIS, H.S.A., VIDOTTO, O. 2001. Erliquiose nos animais e no homem. *Semina: Ci. Agrárias*, 22: 191-201.

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

DAWSON, J.E., BIGGIE, K.L., WARNER, C.K., COOKSON, K., JENKINS, S., LEVINE, J.F., OLSON, J.G. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human disease, in dogs from southeast Virginia. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1175-1179.

DAWSON, J.E., STALLKNECHT, D.E., HOWERTH, E.W., WARNER, C., BIGGIE, K., DAVIDSON, W.R., LOCKHART, J.M., NETTLES, V.F., OLSOM, J.G., CHILDS, J.E. 1994. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2725-2728.

DINIZ, P.P.V.P. 2006. Miocardite em cães com erliquiose monocítica. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

DONATEIN, A., LESTOQUARD, F. 1935. Existence and Algeria d'une rickettsia d'u chien. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 28: 418-419.

DOXIADIS, I., KRUMBACHER, K., REIN, R., NEEFJES, J.J., DOXIADIS, G., SCHOEN, W., PLOEGH, H.L., GROSSE-WILDE, H. 1986. Canine MHC

biochemical definition of class I, class II and class III determinants, similarities and differences to the human and murine systems. *Immunobiology*, 173, 264–265.

- DOYLE, C.K., LABRUNA, M.B., BREITSCHWERDT, E.B., TANG, Y.W., CORSTVET, R.E., HEGARTY, B.C., BLOCH, K.C., LI, P., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7: 504-510.
- DUMLER JS, BARBET AF, BEKKER CP, DASCH GA, PALMER GH, RAY SC, RIKIHISA Y, RURANGIRWA FR. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 51:2145-2165.
- DUMLER, J.S., MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N., BAKKEN, J.S. 2007. Ehrlichiosis in Humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 45:S45–51.
- ESTRADA-PEÑA, A., JONGEJAN, F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology*, 23: 685-715.
- ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. 1992. Tratado de medicina interna veterinária. Volume 2. 3ª Edição. Manole, São Paulo. 2557p.
- EWING, S.A., ROBERSON, W.R., BUCKNER, R.G., HAYAT, C.S. 1971. A new strain of *Ehrlichia canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 159: 1771-1774.
- FABURAY, B., GEYSEN, D., MUNSTERMANN, S., TAOUIK, A., POSTIGO, M., JONGEJAN, F. 2007. Molecular detection of *Ehrlichia ruminantium*

- infection in *Amblyomma variegatum* ticks in The Gambia. *Experimental and Applied Acarology*, 42: 61-74.
- FILONI, C., CATÃO-DIAS, J.L., BAY, G., DURIGON, E.L., JORGE, R.S.P., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2006. First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and *Ehrlichia* Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. *Journal of Wildlife Diseases*, 42: 470-477.
- FRANK, J.R., BREITSCHWERDT, E.B. 1999. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *The Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13, 194-201.
- GALVÃO, M.A.M., LAMOUNIER, J.A., BONOMO, E., TROPIA, M.S., REZENDE, E.G., CALIC, S.B., CHAMONE, C.B., MACHADO, M.C., OTONI, M.E.A., LEITE, R.C., CARAM, C., MAFRA, C.L., WALKER, D.H. 2002. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18: 1593-1597.
- GANTA, R.R., WILKERSON, M.J., CHENG, C., ROKEY, A.M., CHAPES, S.K. 2002. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. *Infection and Immunity*, 70: 380-388.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K., PACHALY, J.R. 1998. Manual de Hematologia Veterinária. 1ª Edição. Livraria Varela, 169p.
- GOLDMAN, E.E., BREITSCHWERDT, E.B., GRINDEM, C.B., HEGARTY, B.C., WALLS, J.J., DUMLER, J.S. 1998. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *The Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12: 61-70.
- GREENE, C.E., BREITSCHWERDT, E.B. 1998. Rocky Mountain spotted fever, Q fever and typhus. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Greene CE (ed.) WB Saunders, Philadelphia, pp. 155–165.
- HARRUS S, KASS PH, KLEMENT E, WANER T. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological

investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record*, 141: 360-363.

HARRUS, S., WANER, T., BARK, H., JONGEJAN, F., CORNELISSEN, W.C.A. 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2745–2749.

HARRUS, S., WANER, T., FRIEDMANN-MORVINSKI, D., FISHMAN, Z., BARK, H., HARMELIN, A. 2003. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96: 239–243.

HOTOPP, J.C., LIN, M., MADUPU, R., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S. V., EISEN, J., SESHADRI, R., REN, Q., WU, M., UTTERBACK, T. R., SMITH, S., LEWIS, M., KHOURI, H., ZHANG, C., NIU, H., LIN, Q., OHASHI, N., ZHI, N., NELSON, W., BRINKAC, L. M., DODSON, R. J., ROISOVOVITZ, M. J., SUNDARAM, J., DAUGHERTY, S. C., DAVIDSEN, T., DURKIN, A. S., GWINN, M., HAFT, D. H., SELLENGUT, J. D., SULLIVAN, S. A., ZAFAR, N., ZHOU, L., BENAHMED, F., FORBERGER, H., HAPLIN, R., MULLIGAN, S., ROBINSON, J., WHITE, O., RIKIHISA, Y., TETTELIN, H. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genetics*, 51: 2145-2165.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: www.ibge.gov.br

JAIN, N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 417p.

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

KAWAHARA, M., TADAHIKO, I., SUTO, C., SHIBATA, S., RIKIHISA, Y., HATA, K., HIRAI, K. 1999. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and

animals with *E. muris* as antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1123–1129.

KELLY, D.J., PIOVESAS-ALVES, F.C., PANG, L., *et al.*, 1997. The seroprevalence of rickettsia, ehrlichia, dengue and leptospira in an apparently healthy brazilian population. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting*.

KOCAN, A.A., LEVESQUE, G.C., WHITWORTH, L.C., MURPHY, G.L., EWING, S.A., BARKER, R.W. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerging Infectious Diseases*. 6, 477-480.

KOCAN, K.M., GOFF, W.L., STILLER, D., CLAYPOOL, P.L., EDWARDS, W., EWING, S.A., HAIR, J.A., BARRON, S.J. 1992. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *Journal of Medical Entomology*, 29: 657-668.

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

LEMOS, E. R.; ALVARENGA, F. B.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M. C.; PADDOCK, C.D.; FEREBEE, T.; ZAKI, S.R.; FERREIRA, F.C.; RAVAFNANI, R. C.; MACHADO, R.D.; GUIMARÃES, M.A; COURA, J.R. 2001. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in a endemic area in the state of São Paulo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:329-334.

LIDDELL, A.M., STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A., SUMNER, J.W., PADDOCK, C.D., GAUDREULT-KEENERE, M., ARENS, M.Q.,

- STRORCH, G.A. 2003. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4617-4622.
- LIN, M., RIKIHISA, Y. 2004. *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF- κ B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cellular Microbiology*, 6: 175–186.
- MACHADO, R.Z., DUARTE, J.M.B., DAGNONE, A.S., SZABÓ, M.P.J. 2006. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Veterinary Parasitology*, 139: 262–266.
- MACIEIRA, D. DE B., MESSICK, J.B., CERQUEIRA, A. DE M., FREIRE, I.M., LINHARES, G.F., ALMEIDA, N.K., ALMOSNY, N.R. 2005. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, 34: 44-48.
- MAVROMATIS, K., DOYLE, C.K., LYKIDIS, A., IVANOVA, N., FRANCINO, M.P., CHAIN, P., SHIN, M., MALFATTI, LARIMER, F., COPELAND, A., DETTER, J.C., LAND, M., RICHARDSON, P.M., YU, X.-J., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W., KYRPIDES, N.C. 2006. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal of Bacteriology*, 188: 4015-4023.
- MORAIS, D., DAWSON, J.E., GUENE, C., FILIPE, A.R., GALHARDAS, L.C., BACELLAR, F. 1991. First European case of ehrlichiosis. *The Lancet*, 338: 633–634.
- MURPHY, G.L., EWING, S.A., WITHWORTH, L.C., FOX, J.C., KOCAN, A.A. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, 79: 325-339.
- NDIP, L.M., NDIP, R.N., ESEMU, S.N., DICKMU, V.L., FOKAM, E.B., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary Microbiology*, 111: 59-66.

- NDIP, L.M., NDIP, R.N., NDIVE, V.E., AWUH, J.A., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. 2007. *Ehrlichia* species in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Cameroon. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 7: 221-227.
- OLANO, J.P., MASTERS, E., HOGREFE, W., WALKER, D.H. 2003. Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri. *Emerging Infectious Diseases*, 9:1579-1586.
- OLIVEIRA, P.R. 2000. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 92: 295-301.
- ORTUÑO, A., GAUSS, C.B.L., GARCÍA, F., GUTIERREZ, J.F. 2005. Serological Evidence of *Ehrlichia* spp. Exposure in Cats from Northeastern Spain. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52: 246–248.
- PADDOCK, C.D., CHILDS, J.E. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 37-64.
- PADDOCK, C.D., FOLK, S.M., SHORE, G.M., MACHADO, L.J., HUYCKE, M.M., SLATER, L.N., LIDDELL, A.M., BULLER, R.S., STORCH, G.A., MONSON, T.P., RIMLAND, D., SUMNER, J.W., SINGLETON, J., BLOCH, K.C., TANG, Y.W., STANDAERT, S.M., CHILDS, J.E. 2001. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1586-1594.
- PAROLA, P., RAOULT, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32:897-928.
- PEREZ, M., BODOR, M., ZHANG, C., XIONG, Q., RIKIHISA, Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078: 110-117.

- PEREZ, M., RIKIHISA, Y., WEN, B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2133-2139.
- POPOV, V.L., CHEN, S.M., FENG, H.M., WALKER, D.H. 1995. Ultrastructural variation of cultured *Ehrlichia chaffeensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 43: 411-421.
- RIKIHISA, Y. 2000. Ehrlichial strategy for survival and proliferation in leukocytes. *Sub-cellular Biochemistry*, 33: 517-538.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., ALBORNOZ, R.E.F., BOLIO, G.M.E. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*, 127: 75-79.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New york: Cold spring harbor laboratory.
- SANTARÉM, V.A., LAPOSY, C.B., DE FARIAS, M.R. 2005. Inclusões plaquetárias semelhantes à *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em Gato. *Colloquium Agrariae*, 1: 60-66.
- SANTOS, F., COPPEDE, J.S., PEREIRA, A.L.A., OLIVEIRA, L.P., ROBERTO, P.G., BENEDETTI, R.B.R., ZUCOLOTO, L.B., LUCAS, F., SOBREIRA, F., MARINS, M. 2007. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *The Veterinary Journal*, in press.
- SHAW, S.E., BIRTLES, R.J., DAY, M.J. 2001. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3: 193-209.
- SHIBATA, S.-I, KAWAHARA, M., RIKIHISA, Y., FUJITA, H., WATANABE, Y., SUTO, C., ITO, T., 2000. New *Ehrlichia* Species Closely Related to *Ehrlichia chaffeensis* Isolated from *Ixodes ovatus* Ticks in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1331-1338.
- SHU-YI LI, J., YAGER, E., REILLY, M., FREEMAN, C., REDDY, G.R., REILLY, A.A., CHU, F.K., WINSLOW, G.M. 2001. Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal

- infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *Journal of Immunology*, 169: 1419-1425.
- SIARKOU, V.I., MYLONAKIS, M.E., BOURTZI-HATZOPOULOU, E., KOUTINAS, A.F. 2007. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*, 125: 304-312.
- SKOTARCZAK, B. 2003. Canine ehrlichiosis. *Annals Agriculture Environment Medicine*, 10: 137-141.
- STUBBS, C.J., HOLLAND, C.J., REIF, J.S., BRUNS, C. 2000. Feline Ehrlichiosis. *Compendium of Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 22: 307-317.
- SUKSAWAT, J., PITULLE, C., ARRAGA-ALVARADO, C., MADRIGAL, K., HANCOCK, S.I., BREITSCHWERDT, E.B. 2001. Coinfection with Three *Ehrlichia* Species in Dogs from Thailand and Venezuela with Emphasis on Consideration of 16S Ribosomal DNA Secondary Structure. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 90-93.
- TALBOT, T.R., COMER, J.A., BLOCH, K.C. 2003. *Ehrlichia chaffeensis* Infections among HIV-infected Patients in a Human Monocytic Ehrlichiosis–Endemic Area. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 1123-1127.
- TRAPP, S.M., DAGNONE, A.S., VIDOTTO, O., FREIRE, R.L., AMUDE, A.M., DE MORAIS, A.S.A. 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*. 140, 223-230.
- UNVER, A., PEREZ, M., ORELLANA, N., HUANG, H., RIKIHISA, Y. 2001. Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2788-2793.
- UNVER, A., RIKIHISA, Y., BORKU, K., OZKANLAR, Y., HANEDAN, B. 2005. Molecular detection and characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Turkey. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 118: 300-304.

- WALKER, D.H., DUMLER, J.S. 1996. Emergence of ehrlichiosis as human health problems. *Emerging Infectious Diseases*, 2: 18-29.
- WALKER, D.H., ISMAIL, N., OLANO, J.P., MCBRIDE, J.W., YU, X.-J., FENG, H.-M. 2004. *Ehrlichia chaffeensis*: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 115: 375-382.
- WANER, T., HARRUS, S., BARK, H., BOGIN, E., AVIDAR, Y., KEYSARY, A. 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69: 307-317.
- WATANABE, M., OKUDA, M., TSUJI, M., INOKUMA, H. 2004. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. *Veterinary Parasitology*, 124: 101–107.
- WEN, B., RIKIHISA, Y., MOTT, J., FUERST, P.A., KAWAHARA, M., SUTO, C. 1995. *Ehrlichia muris* sp. nov., a new species of *Ehrlichia*, identified on the basis of 16S rRNA base sequence, serological, morphological, and biological characteristics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45:250–254.
- WOLF, L., MCPHERSON, T., HARRISON, B., ENGBER, B., ANDERSON, A., WHITT, P. 2000. Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2795.
- YU, X.-J., MCBRIDE, J.W., WALKER, D.H. 2007. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Veterinary Parasitology*, 143: 337-346.
- ZHANG, J.-Z., POPOV, V.L., GAO, S., WALKER, D.H., YU, X.-J. 2007. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. *Cellular Microbiology*, 9: 610-618.
- ZHANG, J.-Z., SINHÁ, M., LUXON, B.A., YU, X.-J. 2004. Survival Strategy of Obligately Intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: Novel Modulation of

Immune Response and Host Cell Cycles. *Infection and Immunity*, 72:
498-507.

APÊNDICE

1. Extração de DNA

TE (pH = 7,4)

10 mM de Tris-Cl (pH = 7,4)

1 mM de EDTA (pH = 8,0)

Aferir o pH, completar o volume com H₂O ultrapura e autoclavar a solução.

Tampão de Extração (200 mL)

Tris-Cl 0,1 M pH = 8,0 20 mL

EDTA 0,5 M pH = 8,0 40 µL

SDS 10% 10 mL

RNAse pancreática 400 µL

H₂O ultrapura q.s.p 200 mL

A RNAse deve ser adicionada após autoclavar a solução.

2. Clonagem

Meio LB líquido (500 mL)

Triptona 5,0 g

Extrato de levedura 2,5 g

NaCl 5,0 g

H₂O ultrapura q.s.p 500 mL

Autoclavar o meio logo após o preparo.

Meio LB sólido (500 mL)

Preparar 500 mL de meio LB líquido e acrescentar 10 g de agar bacteriológico.

Autoclavar o meio logo após o preparo.

3. Purificação dos plasmídeos recombinantes

Solução I

25 mM de Tris-Cl (pH = 8,0)

10 mM de EDTA (pH = 8,0)

50 mM de glicose

Completar o volume com H₂O ultrapura e autoclavar a solução. Armazenar na geladeira.

Solução II

0,2 N de NaOH

1% SDS

Completar o volume com H₂O ultrapura autoclavada. Esta solução deve ser preparada somente na hora do uso.

Solução III

3 M acetato de potássio (pH = 8,0)

2 M ácido acético glacial

Completar o volume com H₂O ultrapura e autoclavar a solução. Armazenar na geladeira.