

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Aspectos epidemiológicos, hematológicos e
diversidade genética de *Ehrlichia canis* em cães
trombocitopênicos de duas mesorregiões do estado
do Rio de Janeiro**

Jônathan David Ribas Chagas

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**Aspectos epidemiológicos, hematológicos e diversidade genética
de *Ehrlichia canis* em cães trombocitopênicos de duas
mesorregiões do estado do Rio de Janeiro**

JÔNATHAN DAVID RIBAS CHAGAS

Sob a orientação da Professora Doutora
Bruna de Azevedo Baêta

E coorientação de
Cláudia Bezerra da Silva
Matheus Dias Cordeiro

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências
Veterinárias**, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Setembro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C426a Chagas, Jônathan David Ribas, 1997-
Aspectos epidemiológicos, hematológicos e
diversidade genética de Ehrlichia canis em cães
trombocitopênicos de duas mesorregiões do estado do
Rio de Janeiro / Jônathan David Ribas Chagas. -
Vassouras, RJ, 2023.
56 f.: il.

Orientadora: Bruna de Azevedo Baêta.
Coorientadora: Claudia Bezerra da Silva .
Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias , 2023.

1. bactéria intracelular . 2. caracterização
molecular . 3. epidemiologia . 4. hematologia . I.
Baêta, Bruna de Azevedo, 1984-, orient. II. Silva ,
Claudia Bezerra da, 1984-, coorient. III. Cordeiro,
Matheus Dias, 1983-, coorient. IV Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias . V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 3945/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.064977/2023-82

Seropédica-RJ, 26 de setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JONATHAN DAVID RIBAS CHAGAS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/09/2023

(Assinado digitalmente em 27/09/2023 09:29)
BRUNA DE AZEVEDO BAETA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###475#9

(Assinado digitalmente em 26/09/2023 16:41)
MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###034#8

(Assinado digitalmente em 26/09/2023 19:59)
NATHALIE COSTA DA CUNHA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.207-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3945, ano: 2023, tipo: ATA, data de emissão: 26/09/2023 e o código de verificação: ec95dd9858

Dedico à minha mãe, por ser minha base,
razão e força. Nunca foi fácil, mas sempre tive
você ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha gratidão a Deus e à minha família por estarem sempre ao meu lado nos momentos felizes e difíceis. Tenho a esperança de poder retribuir todo o apoio, carinho e incentivo que recebi ao longo da vida.

À pessoa que me ensinou a ser quem eu sou hoje, minha mãe Neuza Ribas, por todo carinho, apoio e amor sempre recebido. Amo-te!

À minha orientadora Prof. Dr^a. Bruna de Azevedo Baêta por todo ensinamento, orientação, paciência, confiança e carinho. Além disso, quero agradecer por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava de minhas próprias habilidades. Sua fé em meu potencial foi um impulso fundamental para a minha confiança e motivação ao longo deste projeto.

Aos meus orientadores Prof. Dr^a. Cláudia Bezerra da Silva e Prof. Dr. Matheus Dias Cordeiro, por compartilhar todo o conhecimento, sugestões e comentários construtivos que moldaram meu pensamento e me ajudaram a superar desafios que pareciam insuperáveis.

À professora Renata Fernandes Ferreira de Moraes, por toda disponibilidade, apoio e ajuda na elaboração deste trabalho. Você me inspira muito. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP): Ana Clara Félix, Gilliard Ferreira, Aline Furtado, João Caetano, Renata Silva, Marcela Dantas, Fernanda Campos, Lívia Azevedo, Izabela Mesquita, Karoline Alves, Davi Guimarães, Cassiane Freitas e Neide Gomes, por todos os momentos de distração e palavras de motivação.

Agradeço também aos meus amigos: Isadora Dias, Marcos Pereira, Maiara Vasconcelos, Ellen Meireles, Eduardo Sena e Wendel Benac, por toda ajuda na análise das amostras e tabulação dos dados, além do apoio concedido a mim. Obrigado por tudo!

Ao Diogo Maia e Olívia Zen pela motivação, apoio e ligações de longa duração. Quando enfrentamos desafios, devemos nos unir e apoiar uns aos outros para superá-los, e assim nós fizemos. Foi essencial tê-los nessa reta final da dissertação.

Aos meus amigos, Valéria Aparecida, Letícia Meirelles, Eduarda Machado, Isaac Lira e Yolanda Lopes, que me ajudam a ser firme diariamente e me dão forças para continuar a caminhada.

Ao Prof. Dr. Douglas McInstosh, por todo o suporte fornecido no sequenciamento das amostras.

Ao laboratório de Patologia clínica veterinária - LABOCANI por cederem as amostras e estarem sempre dispostos a ajudarem no que fosse preciso.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela recepção e acolhimento.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Jônathan David Ribas Chagas, filho de Gilmar da Silva Chagas e Neuza Maria David Ribas, nasceu em 30 de abril de 1997 no município de Vassouras, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental e o ensino médio no Colégio Estadual Centenário, em Vassouras, Rio de Janeiro, concluindo em 2014.

Durante o ensino médio atuou como bolsista Jovens Talentos, FAPERJ, no projeto de pesquisa com ênfase em matemática inclusiva para crianças (2013-2014).

Em 2015, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras.

Durante a graduação realizou estágio em diversas áreas, sendo bolsista de Iniciação Tecnológica – CNPq na área de Parasitologia com ênfase no diagnóstico de agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina no município de Vassouras (2017-2019). Atuou como bolsista voluntário de iniciação científica com foco em ações de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar e visceral (2017-2018) e de 2017 a 2019 foi monitor voluntário das disciplinas de laboratório clínico I e II, concluindo o curso de Medicina Veterinária em julho de 2019.

Em março de 2020, passou na seleção do Programa de Residência Multiprofissional, Área de concentração Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde atuou como residente até fevereiro de 2022.

Em março de 2022, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, no nível de Mestrado, sendo bolsista CAPES.

Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

RESUMO

CHAGAS, J. D. R. **Aspectos epidemiológicos, hematológicos e diversidade genética de *Ehrlichia canis* em cães trombocitopênicos de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.** 2023. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Ehrlichia canis é uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, responsável pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC), cuja transmissão ocorre por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Sua distribuição é favorecida por regiões de clima temperado, subtropical e tropical, sendo descrita em todas as regiões do Brasil, com prevalências que variam de 4,8 a 65% em cães de ambiente urbano ou rural. Estudos com *E. canis* identificaram proteínas imunorreativas que apresentam antígenos espécie-específicos e estão relacionadas à interação parasito-hospedeiro, fornecendo informações sobre a diversidade genética do patógeno. Nesse contexto, o estudo objetivou analisar os aspectos epidemiológicos, hematológicos e diversidade genética de *E. canis* utilizando o gene *TRP36* em amostras de sangue total de cães trombocitopênicos naturalmente infectados provindos de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. No estudo, 404 amostras de sangue total de cães trombocitopênicos, das mesorregiões Metropolitana e Sul Fluminense, do estado do Rio de Janeiro, foram utilizadas. A análise molecular foi realizada usando os genes *dsb*, *p28* e *TRP36*. Além disso, as variáveis sexo, raça e idade dos cães foram utilizadas para avaliar a correlação com a positividade para *E. canis*. Das amostras analisadas, 21,04% (85/404) amplificaram para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. e para o gene *p28* de *E. canis*. Dessas, houve amplificação de 34,11% (29/85) para o gene *TRP36*. Para o sequenciamento e análise da diversidade genética foram selecionadas de forma aleatória 15 amostras para o gene *TRP36*. Analisando as sequências obtidas com o gene codificador *TRP36*, observou-se que quatro sequências do estudo demonstraram um padrão de repetição de aminoácidos TEDSVSAPA e onze sequências codificaram o padrão de repetição ASVVPEAE. A diminuição do hematócrito, hemoglobina e concentração de proteínas plasmáticas foram alterações hematológicas evidenciadas. Dentre as variáveis estudadas, apenas a variável idade (cães trombocitopênicos com idade até 12 meses) tiveram correlação com a positividade para *E. canis*. Os resultados demonstram que existem dois genótipos de *E. canis* circulantes no estado do Rio de Janeiro e que cães trombocitopênicos jovens foram os mais infectados pela bactéria.

Palavras- chave: bactéria intracelular, caracterização molecular, epidemiologia, hematologia

ABSTRACT

CHAGAS, J. D. R. **Epidemiological, hematological aspects and genetic diversity of *Ehrlichia canis* in thrombocytopenic dogs from two mesoregions of the state of Rio de Janeiro.** 2023. 56p. Dissertation (Master of Science). Graduate Program in Veterinary Sciences. Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Ehrlichia canis is a Gram-negative, obligate intracellular bacterium responsible for Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME), which is transmitted by *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. Its distribution is favored by temperate, subtropical and tropical climates, and has been described in all regions of Brazil, with prevalence rates ranging from 4.8 to 65% in dogs from urban or rural environments. Studies with *E. canis* have identified immunoreactive proteins that present species-specific antigens and are related to host-parasite interactions, providing information on the genetic diversity of the pathogen. In this context, the study aimed to analyze the epidemiological, hematological aspects and genetic diversity of *E. canis* using the *TRP36* gene in whole blood samples from naturally infected thrombocytopenic dogs from two mesoregions of the state of Rio de Janeiro. In the study, 404 whole blood samples from thrombocytopenic dogs from the Metropolitan and South Fluminense mesoregions of the state of Rio de Janeiro were used. Molecular analysis was performed using the *dsb*, *p28* and *TRP36* genes. In addition, the variables sex, breed and age of the dogs were used to evaluate the correlation with positivity for *E. canis*. Of the samples analyzed, 21.04% (85/404) amplified the *dsb* gene of *Ehrlichia* spp. and the *p28* gene of *E. canis*. Of these, there was amplification of 34.11% (29/85) for the *TRP36* gene. For sequencing and analysis of genetic diversity, 15 samples were randomly selected for the *TRP36* gene. Analyzing the sequences obtained with the *TRP36* coding gene, it was observed that four sequences of the study demonstrated a TEDSVSAPA amino acid repeat pattern and eleven sequences encoded the ASVVPEAE repeat pattern. The decrease in hematocrit, hemoglobin and plasma protein concentration were hematological alterations evidenced. Among the variables studied, only the age variable (thrombocytopenic dogs up to 12 months of age) correlated with positivity for *E. canis*. The results demonstrate that there are two genotypes of *E. canis* circulating in the state of Rio de Janeiro and that young thrombocytopenic dogs were the most infected by the bacteria.

Keywords: intracellular bacteria, molecular characterization, epidemiology, hematology

LISTA DE ABREVIACÕES

μ L – Microlitro
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
EDTA- Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EMC- Erliquiose Monocítica Canina
h - Hora
mg - Miligrama
min - Minuto
mL – Mililitro
mM - Milimolar
pb- pares de base
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
rpm – Rotação por minuto
TRP- Sequências repetidas em Tandem
V – Volts
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
dUTP: desoxiuridina trifosfato
dTTP: desoxitimina trifosfato
p: p-valor
dsb: ligação dissulfeto
p28: gene que codifica a proteína de superfície
gp36: glicoproteína de membrana
rRNA: ácido ribonucleico ribossomal
°C: Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Ehrlichia canis* no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Fonte: Arquivo pessoal. Programa: Canva3
- Figura 2.** Localização das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, destacando as cidades que foram obtidas sangue de cães. Fonte: Arquivo pessoal10
- Figura 3.** Representação dos produtos de PCR para o gene GAPDH de mamíferos (400pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder; Poços 2-28: amostras positivas; Poço 29: controle negativo.16
- Figura 4.** Representação dos produtos de PCR para o gene dsb de *Ehrlichia* spp. (683pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder; poços 2, 5,6, 9,13 e 15: amostras testes positivas; poços 3-4, 7-8, 10-12, 14, 16-28: amostras testes negativas; poço 29: controle negativo; poço 30: controle positivo.....16
- Figura 5.** Representação dos produtos de PCR para o gene *p28* de *E. canis* (843pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2-8, 10-14, 17-22, 24, 27-28: Amostras testes positivas. Poço 9, 15-16, 23, 25-26, 29: Controles negativos; Poço 30: Controle positivo.17
- Figura 6.** Representação dos produtos de PCR para o gene *TRP36* de *E. canis* (800-1000pb), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visuali visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2-7, 10-14, 16-21, 23-28: Amostras testes positivas. Poço 9: Amostra teste exluída do estudo. Poço 8, 15, 22, 29: Controles negativos; Poço 30: Controle positivo.....17
- Figura 7.** Dendograma baseado nas sequências de *Ehrlichia canis* a partir do gene *TRP36* das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendograma foi construído usando o método de Máxima Verossimilhança. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA 11. Como *outgroup* foi utilizado a sequência *Ehrlichia chaffeensis* strain Sapulpa (DQ085431).21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Similaridade entre as sequências de TRP36 de Ehrlichia canis do estudo e sequências depositadas no Genbank.....	18
Tabela 2. Diferenças de aminoácidos do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre as sequências de E. canis (TEDSVSAPA) obtidas de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e sequência referência depositada no Genbank.	19
Tabela 3. Diferenças de aminoácidos do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre as sequências de E. canis (ASVVPEAE) obtidas de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e sequência referência depositada no Genbank.	20
Tabela 4. Média, desvio padrão e amplitude dos valores hematológicos quantitativos dos animais trombocitopênicos positivos e negativos para E. canis.	22
Tabela 5. Alterações hematológicas observados em cães trombocitopênicos naturalmente infectados por E. canis e comparação com animais trombocitopênicos negativos.....	23
Tabela 6. Análise da discordância entre o teste citológico e PCR, comparando os resultados das amostras trombocitopênicas utilizadas no presente estudo.	24
Tabela 7. Frequência de positividade de sangue de cães trombocitopênicos para E. canis, através da PCR e o gênero.....	25
Tabela 8. Frequência de positividade de sangue de cães trombocitopênicos para E. canis, através da PCR e o tipo racial.	25
Tabela 9. Frequência de positividade de sangue de cães trombocitopênicos para E. canis, através da PCR e a idade.	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências do gene <i>TRP36</i> de <i>Ehrlichia canis</i> obtidos no Genbank para o estudo.....	15
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Taxonomia – <i>Ehrlichia canis</i>	2
2.2 Agente etiológico.....	2
2.3 Transmissão e Ciclo biológico.....	2
2.4 Distribuição e Epidemiologia da erliquiose monocítica canina no Brasil	3
2.5 Diagnóstico.....	5
2.5.1 Direto.....	5
2.5.2 Sorologia.....	5
2.5.3 Biologia molecular.....	6
2.5.4 Isolamento.....	6
2.6 Caracterização molecular e Diversidade genética de <i>Ehrlichia canis</i>	7
2.7 Alterações hematológicas nas hemoparasitoses de cães.....	8
2.7.1 Erliquiose canina.....	8
2.7.2 Babesiose canina.....	8
2.7.3 Trombocitopenia cíclica canina	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Local do estudo e coleta das amostras.....	10
3.2 Análise hematológica.....	11
3.3 Obtenção de informações sobre gênero, raça e idade.....	11
3.4 Extração de DNA e Verificação do Gene Endógeno.....	11
3.5 Detecção molecular de <i>Babesia</i> sp. e <i>Anaplasma platys</i>	12
3.6 Detecção molecular de <i>Ehrlichia</i> spp.....	12
3.7 Amplificação e caracterização molecular de <i>Ehrlichia canis</i> utilizando os genes <i>p28</i> e <i>TRP36</i>	13
3.8 Eletroforese e análise dos resultados.....	14
3.9 Análise estatística.....	14
3.10 Sequenciamento genético e Análise filogenética.....	14
4 RESULTADOS.....	16
4.1 Detecção do DNA de <i>Ehrlichia canis</i> em sangue de cães trombocitopênicos.....	16
4.2 Análise do alinhamento sequências de nucleotídeos do gene <i>TRP36</i> de <i>E. canis</i> ...	18
4.3 Análise hematológica dos cães trombocitopênicos positivos para <i>E. canis</i>	21
4.4 Análise das inclusões sugestivas de <i>E. canis</i> em esfregaço sanguíneo.....	23
4.5 Fatores associados a positividade de cães à <i>Ehrlichia canis</i>	24
5 DISCUSSÃO.....	26
6 CONCLUSÃO.....	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é caracterizada como uma pequena bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, sendo o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC), também conhecida como Pancitopenia Tropical Canina e transmitida pelo carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Ferreira *et al.*, 2014; Arroyave *et al.*, 2020).

Mundialmente, a doença está distribuída em várias regiões como o sudeste da Ásia, África, Europa, Índia, América Central e a América do Norte, sendo favorecida por regiões com clima temperado, tropical e subtropical (Almosny, 2002; Silva *et al.*, 2011). Desta maneira, a doença já foi descrita em vários estados do Brasil, onde comprovações epidemiológicas constataam que a prevalência varia de 4,8 a 65% em cães de ambiente urbano ou rural (Moraes *et al.*, 2004; Saito, 2009). Apesar de *E. canis* está associada principalmente a infecção canina, infecções humanas já foram relatadas na Venezuela (Perez *et al.*, 2006), Panamá (Daza *et al.*, 2018), e em amostras de doadores em um banco de sangue humano na Costa Rica (Bouza-Mora *et al.*, 2016).

O diagnóstico da erliquiose canina pode ser realizado através da visualização de mórulas no citoplasma dos leucócitos do sangue. Porém, a não observação dessas estruturas, não exclui a possibilidade de infecção (Dagnone *et al.*, 2001). Testes sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) podem ser utilizados, porém reações cruzadas podem ocorrer com outros agentes erliquiais, dificultando o diagnóstico da enfermidade (Harrus; Waner, 2011). Técnicas moleculares também podem ser empregadas, sendo a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), uma técnica sensível e específica. Além disso, a PCR é uma ferramenta eficaz para diferenciar a infecção crônica dos animais que apenas apresentam anticorpos contra *E. canis* por exposição ao agente (McBride *et al.*, 1996).

Estudos com proteínas imunorreativas identificaram regiões de repetição seriada (TRP) no genoma de *E. canis*. Essas glicoproteínas são imunorreativas e possuem antígenos específicos da espécie e estão intimamente relacionados à interação parasito-hospedeiro (Cárdenas *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). A glicoproteína de fase aguda (TRP36) é exposta na superfície bacteriana e secretada no citoplasma do hospedeiro (Ferreira *et al.*, 2014). O gene fornece informações sobre a diversidade genética de *E. canis*, sendo utilizado para genotipagem de cepas de *E. canis* com base nas diferenças no número de repetições em tandem ou sequências (Aguiar *et al.*, 2013; Bouza-Mora *et al.*, 2016; Cabezas-Cruz *et al.*, 2014). Em algumas sequências, essa variação é de 12 a 15 repetições (Long *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008).

A proteína da superfície externa de 28 kDa (p28) é codificada por um locus multigênico, que possui pelo menos 22 alelos do gene p28 (p28-1 a p28-22) nos cromossomos de *E. canis* e *E. chaffeensis* (Long *et al.*, 2002). Além disso, na América do Norte, o gene p28 se mostrou conservado em todas as sequências de *E. canis*, permitindo a produção de antígenos vacinais (McBride *et al.*, 2000). Diferenças genéticas foram confirmadas entre sequências de *E. canis* do Brasil e de outras partes do mundo (Zhang *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2013). Nesse sentido, este estudo objetivou analisar os aspectos epidemiológicos, hematológicos e diversidade genética de *E. canis* utilizando o gene *TRP36* em amostras de sangue total de cães trombocitopênicos naturalmente infectados provindos de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia – *Ehrlichia canis*

Filo: Proteobacteria Garrity *et al.*, 2005

Classe: Alphaproteobacteria Garrity *et al.*, 2006

Ordem: Rickettsiales (Gieszczykiewicz, 1939) Dumler *et al.*, 2001

Família: Anaplasmataceae (Philip, 1957) Dumler *et al.*, 2001

Gênero: *Ehrlichia* (Moshkovski, 1945)

Espécie: *Ehrlichia canis*

2.2 Agente etiológico

Ehrlichia canis é uma bactéria gram-negativa, pleomórfica (cocoide ou elipsoide), intracelular obrigatória (Ferreira, 2012), que pode infectar leucócitos como monócitos, macrófagos e neutrófilos de mamíferos (Aguilar *et al.*, 2020) e plaquetas (Dagnone *et al.*, 2009).

Suas inclusões são intracitoplasmáticas e classificadas em corpúsculos elementares, corpúsculos iniciais e mórulas. Os corpúsculos elementares são estruturas arredondadas de vários tamanhos que podem ser vistos dentro dos vacúolos no citoplasma dos leucócitos, onde a junção desses são denominados de mórulas. Os corpúsculos iniciais são formados por diversos grânulos. Além disso, esses microrganismos são imóveis e não cultiváveis em meios sem células e ovos embrionados (Almosny; Massard, 2002; Ferreira, 2012).

2.3 Transmissão e Ciclo Biológico

A transmissão de *E. canis* ocorre principalmente pelo carrapato vetor *R. sanguineus* sensu lato (Cicuttin *et al.*, 2015; Ferrolho *et al.*, 2017; Ipek *et al.*, 2018). Os leucócitos que possuem as mórulas de *E. canis* quando são ingeridas pelo carrapato, a bactéria se multiplica nos hemócitos e nas células da glândula salivar, e ocasionalmente, penetram no trato digestivo, infectando as células do trato intestinal. Posto isso, a transmissão ao cão ocorre no momento do repasto sanguíneo, onde o vetor inocula sua saliva no local da picada, gerando uma reação inflamatória local, mobilizando leucócitos e favorecendo a disseminação da bactéria no hospedeiro (Almosny & Massard, 2002; Aguilar *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2008). Ocorre perpetuação transtadial e o carrapato infectado pode transmitir o agente por até 155 dias (Aziz *et al.*, 2022).

A bactéria quando penetra no hospedeiro, é fagocitada pelos monócitos, dando origem aos corpúsculos elementares, onde crescem e se multiplicam, evoluindo para corpúsculos iniciais. Os corpúsculos iniciais se desenvolvem e se dividem entre o sétimo e décimo segundo dia consecutivos, derivando novos corpúsculos elementares formando as mórulas. Ressalta-se que uma mesma célula pode conter mais de uma mórula, e cada mórula contém vários corpúsculos elementares. Após três a quatro dias, através da ruptura da célula hospedeira ou processo de exocitose, essas mórulas liberam os corpúsculos elementares, perfazendo o ciclo infeccioso de *E. canis* (Figura 1) (Macedo, 2007).

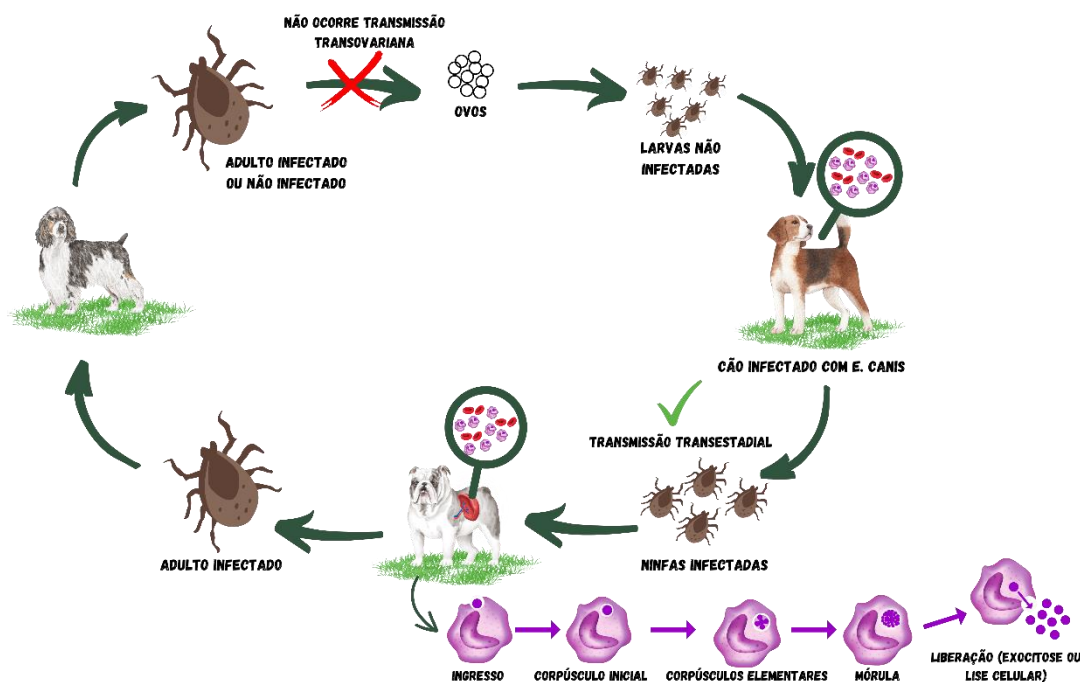


Figura 1. Ciclo biológico de *Ehrlichia canis* no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Fonte: Arquivo pessoal. Programa: Canva

A transmissão também pode ocorrer por meio de transfusões sanguíneas, componentes sanguíneos ou agulhas contaminadas, especialmente em regiões onde a doença é endêmica. Essa forma de transmissão pode resultar no desenvolvimento de enfermidades nos indivíduos receptores (Diniz; Aguiar, 2022).

2.4 Distribuição e Epidemiologia da erliquiose monocítica canina no Brasil

Novas doenças surgiram em diferentes regiões geográficas devido a locomoção de animais pelo mundo, o que gerou um caráter cosmopolita, em especial aquelas que possuem o carrapato como vetor (Shaw *et al.*, 2001).

A distribuição de *E. canis* é cosmopolita e está intimamente relacionada ao carrapato vetor, estando concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (Rar; Golovljova, 2011). Com isso, a erliquiose monocítica canina (EMC) no Brasil é de ampla ocorrência, devido a alta prevalência do vetor nas áreas urbanas (Aguiar *et al.*, 2007a), estando distribuída em vários estados brasileiros.

Estudos demonstram que, em média, 20 a 30% dos cães atendidos em clínicas e hospitais veterinários em vários estados das cinco regiões do Brasil, apresentam anticorpos contra antígenos de *E. canis* e/ou são positivos nos testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Dagnone *et al.*, 2001; Aguiar *et al.*, 2007).

No estado de São Paulo, em um estudo realizado em cães atendidos no Hospital Veterinário de Botucatu, os autores identificaram uma positividade em 40% (28/70) dos animais através da técnica de PCR (Ueno *et al.*, 2009). Santos *et al.* (2007), identificaram em Ribeirão Preto, o DNA dessa bactéria em 38,9% dos cães utilizados no estudo. No Hospital Veterinário da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 68% dos cães atendidos, alguns com sinais clínicos sugestivos de erliquiose canina, apresentaram títulos compatíveis com a presença de anticorpos anti-*E. canis* (Aguiar *et al.*, 2007a). Num estudo realizado no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, região Sul de São Paulo, 42,6% (23/54) dos cães foram positivos em testes sorológicos e 16,7% (9/54)

positivos em testes sorológicos e técnicas moleculares (Queiroz *et al.*, 2022).

Na região sudeste, do estado do Rio de Janeiro, um estudo avaliou a presença de *E. canis* em 390 cães, onde 24,8% foram considerados positivos (Paulino *et al.*, 2018). Ao analisar sangue de cães em seis mesorregiões do mesmo estado, Lins e seus colaboradores (2019), relataram através da PCR em tempo real, uma positividade de 42,3% (113/267) para *E. canis*. A ocorrência desta riquetsia também foi descrita por Ferreira *et al.* (2014), ao analisarem sangues obtidos das regiões Metropolitana e Serrana do Rio de Janeiro. De um total de 300 amostras sanguíneas de cães, 5% (15) foram positivas através da técnica de PCR.

Na cidade de Belo Horizonte, Moreira *et al.* (2003), realizaram um estudo retrospectivo com 194 fichas clínicas de animais com suspeita de hemoparasitoses, onde 15,9% (31/194) apresentavam *E. canis* no exame parasitológico direto em esfregaços sanguíneos.

Na região sudoeste do Paraná, não houve amplificação do DNA do agente em cães domiciliados (Ribeiro *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2012), detectaram através da técnica de PCR, quarenta e dois (16,4%) cães domiciliados positivos para *E. canis*, na cidade de Jataizinho, região Norte do Paraná. Utilizando técnicas sorológicas, Vieira *et al.* (2013), obtiveram uma prevalência de 44,9% (62/138) em duas populações caninas (urbana e rural) no estado do Paraná. Em dois municípios de Santa Catarina (Blumenau e Lages), não houve detecção de *E. canis* em cães, através da técnica de PCR quantitativa (Rodrigues, 2017).

Costa e seus colaboradores (2015) avaliaram por métodos sorológicos e moleculares a exposição e infecção de *E. canis* em cães de áreas urbanas e rurais do município de Chapadinha, estado do Maranhão. Com isso, 14,6% (47/322) e 2,8% (9/322) dos cães apresentaram-se sororreagentes nos métodos sorológicos e positivos nos métodos moleculares, respectivamente. Outro estudo utilizando 472 cães domiciliados em Salvador (BA), determinou a prevalência de 35,6% (168/472), através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Desses animais sororreagentes, uma nested-PCR foi realizada, onde detectaram 58 (34,5%) cães positivos para *E. canis* (Souza *et al.*, 2010). No estado da Paraíba, o DNA de *E. canis* foi detectado em 8,9% (64/719) das amostras de sangue canino, através de PCR em tempo real (Rotondano *et al.*, 2017).

O estudo desenvolvido por Paula *et al.* (2021) investigaram a soroprevalência de *E. canis* em cães encaminhados para um hospital veterinário-escola no estado de Goiás. Dos 264 cães testados para anticorpos anti-*E. canis* por meio da técnica RIFI, 59,1% (156/264) foram positivos. Em Cuiabá (MT), foram detectados através de técnica sorológica (RIFI) um percentual de 45% (9/20) e através da PCR um total de 6 (30%) cães positivos para *E. canis*. No Distrito Federal, a positividade de cães para a bactéria através da PCR foi de 6,79% (14/206), em estudos realizados por Horotato (2021).

Em Rio Branco, estado do Acre, foram detectados na PCR e posterior sequenciamento genético, a positividade em 61,42% (43/70) dos cães estudados (Kassab, 2021). Em cães do município de Ji-Paraná, estado de Rondônia, foram analisadas 177 amostras de soro e sangue por meio reação RIFI e reação da PCR, respectivamente, onde anticorpos anti-*E. canis* foram detectados em 24,29% (43/177) das amostras de soro, e 22,03% (39/177) nas amostras de sangue analisadas molecularmente (Pacheco *et al.*, 2021). Amostras de sangue de cães domiciliados e errantes do município de Belém, Pará, foram analisados por nested-PCR para a pesquisa de *E. canis*, onde foi detectado em 39,4% (109/276) das amostras (Brandão *et al.*, 2019).

Ressalta-se que, a prevalência da erliquiose canina no Brasil pode ser influenciada por diversos fatores como: condições climáticas, distribuição do vetor, população estudada, habitat e comportamento animal, assim como a metodologia aplicada na perquirição do agente (Dagnone *et al.*, 2001).

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Esfregaço sanguíneo

A visualização de mórulas em células mononucleares em esfregaços de sangue periférico, sugere o diagnóstico de EMC, sendo uma técnica simples e não onerosa (Dagnone *et al.*, 2001), porém é considerada uma técnica de baixa sensibilidade (0-10%) em sangue periférico (Diniz; Aguiar, 2022). Além de leucócitos, plaquetas também podem ser infectadas por *E. canis*, dificultando o diagnóstico preciso da espécie envolvida. Com isso, é recomendado para o diagnóstico correto de mórulas em leucócitos e plaquetas, a associação com técnicas sorológicas ou moleculares para determinação da espécie envolvida (Dagnone *et al.*, 2009).

O esfregaço de capa leucocitária aumenta a sensibilidade na detecção de mórulas de *E. canis*. Mylonakis *et al.* (2003), após avaliarem a sensibilidade de cinco técnicas de citologia, de 50 cães naturalmente infectados e em fase aguda de erliquiose, na objetiva de imersão (100X), em um total de 1.000 campos, alcançaram uma sensibilidade de 66% em esfregaço de capa leucocitária.

É importante salientar que plaquetas, grânulos azurófilos linfocíticos e material nuclear fagocitado, podem ser confundidos com inclusões erliquiais, assim como infecção em monócitos por outros agentes pertencentes a família Anaplasmataceae (Harrus; Waner, 2011).

2.5.2 Sorologia

Para o diagnóstico de EMC foram desenvolvidos vários métodos sorológicos, sendo de grande valia para triagem e/ou diagnóstico. O teste RIFI tem a capacidade de detectar anticorpos anti-*E. canis* no sétimo dia pós-infecção, entretanto, pode indicar apenas exposição prévia ao agente, uma vez que os anticorpos IgG anti-*E. canis* permanecem no hospedeiro por meses a anos após o tratamento e eliminação da riquetsia. Para infecções agudas, recomenda-se o uso de dois testes paralelos com intervalos de 7 a 14 dias, onde um aumento de 4 vezes nos títulos de anticorpos sugerem infecção ativa (Harrus; Waner, 2011). Anticorpos IgM não são considerados um bom indicador de exposição a bactéria, pois no curso da doença sua produção é inconsistente (McBride *et al.*, 2003).

Testes sorológicos baseados em ensaios imunoenzimáticos ELISA foram desenvolvidos. Durante a infecção, o TRP19 e o TRP36 de *E. canis* desempenham papéis fundamentais como principais proteínas imunorreativas e alvos primários da resposta de anticorpos do hospedeiro. Para determinar a sensibilidade e especificidade dessas proteínas no imunodiagnóstico espécie-específico, estudos foram realizados utilizando proteínas recombinantes e ensaios baseados em peptídeos sintéticos (Doyle *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007; McBride *et al.*, 2007). Foram identificados os principais epítomos de anticorpos nas regiões de repetição em tandem dos TRPs de *E. canis* e *E. chaffeensis*. Esses epítomos apresentam distinções moleculares, possibilitando a detecção de anticorpos específicos para cada espécie (Aguiar *et al.*, 2016), sendo fundamental para identificar o agente infeccioso. Nesse sentido, ensaios peptídeos baseados em ELISA utilizando as proteínas TRP19 e TRP36 estão sendo desenvolvidos para detectar infecções por diferentes genótipos de *E. canis* (Aguiar *et al.*, 2016; Taques *et al.*, 2020; Medeiros *et al.*, 2020).

Os kits Dot-ELISA para a detecção de anticorpos IgG de *E. canis* estão disponíveis comercialmente e são comumente usados na rotina clínica. Dentre eles, podemos citar: o teste Immunocomb dot-ELISA (Biogal, Galed Laboratories) e o ensaio SNAP® 4Dx®Plus, que utiliza peptídeos sintéticos derivados das principais proteínas imunodominantes de *E. canis* P30 e P30-1 (IDEXX Laboratories) (Medeiros *et al.*, 2020). Esses testes geralmente são utilizados como exames de triagem em animais com suspeição de erliquiose (Marques; Gomes, 2020).

O diagnóstico sorológico da EMC pode ser dificultado pela reação cruzada dos anticorpos contra *E. canis* com outros agentes erliquiais. Anticorpos contra *E. canis* são conhecidos por reagir de forma cruzada com antígenos de *Neorickettsia helminthoeca* e *N. risticii*. A RIFI não pode discriminar entre anticorpos *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* (Harrus; Waner, 2011).

Os sinais clínicos do animal avaliado são relevantes e devem ser sempre considerados, uma vez que os testes sorológicos podem indicar que o cão está com a infecção ou teve contato com o patógeno, tendo anticorpos contra ele circulando. Com esse viés, o médico veterinário deve levar em consideração os exames clínicos e ter em mente que apenas um teste diagnóstico não é suficiente para determinar se um cão tem erliquiose ou não, sendo útil a incrementação de um teste molecular e um teste sorológico para fechar o diagnóstico (Medeiros *et al.*, 2020).

2.5.3 Detecção molecular

A amplificação enzimática de uma parte específica do DNA alvo pode ser realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é rápida, sensível e específica para detecção de microrganismos (Rodriguez, 1997).

A técnica PCR é uma ferramenta eficaz para diferenciar a infecção crônica dos animais que apenas apresentam anticorpos contra *E. canis* por exposição e problemas à sensibilidade inadequada e dificuldade com o diagnóstico diferencial são superados com a PCR (McBride *et al.*, 1996). Porém, cabe ressaltar que resultados falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer (Harrus; Waner, 2011).

Esta técnica é eficaz na detecção de *E. canis* em tecidos de cães nas fases subclínica e crônica, uma vez que a detecção em sangue total seja dificultada pelos baixos níveis de parasitemia (Rodriguez-Alarcón *et al.*, 2020). Os autores analisaram através da PCR a prevalência de *E. canis* em amostras de sangue, fígado, baço, linfonodo e medula óssea de 59 cães recém-eutanasiados que apresentavam carrapatos, porém eram clinicamente saudáveis. Sendo assim, demonstraram que, embora a infecção em órgãos tenha sido 30% menor em cães negativos pela PCR de amostras de sangue em comparação com aqueles que foram positivos, um número considerável de cães (n =19 ou 61,30%) com resultados negativos pela PCR de sangue foram positivos para *E. canis* em algum dos tecidos (Rodriguez-Alarcón *et al.*, 2020).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é mais sensível que a PCR convencional e permite a quantificação da carga bacteriana. Tem sido utilizado para a quantificação da carga erliquial em cães naturalmente e experimentalmente infectados (Baneth *et al.*, 2009).

A PCR (convencional ou em tempo real) tem algumas vantagens sobre a sorologia, a saber: detecção precoce de DNA antes que ocorra a soroconversão, maior sensibilidade e a detecção de DNA erliquial em vez de anti - *E.canis*, provavelmente indicando infecção ativa em vez de exposição (Harrus; Waner, 2011).

2.5.4 Isolamento em cultivo celular

O isolamento de *E. canis* pode ser realizado em células da linhagem DH82, que foram adaptadas em cultivo celular a partir de células obtidas de um caso de histiocitoma (Aguiar *et al.*, 2007a). O método é sensível e definitivo para o diagnóstico de *E. canis*, porém é uma técnica demorosa, trabalhosa e carece de espaço físico adequado. Além disso, o crescimento pode demorar até 10 semanas após a inoculação do agente. Posto isso, o isolamento é mais utilizado em laboratórios de pesquisa do que como ferramenta de diagnóstico na rotina laboratorial (Harrus; Waner, 2011).

2.6 Caracterização molecular e Diversidade genética de *Ehrlichia canis*

Os microrganismos envolvidos em uma infecção têm uma origem clonal, onde compartilham fatores de virulência, traços bioquímicos e características genômicas semelhantes. Além disso, alguns fatores como isolamento geográfico, isolamento de diferentes fontes e em diferentes momentos podem favorecer variabilidade genética em organismos da mesma espécie, classificando-os em subtipos, isolados ou cepas mediante marcadores moleculares específicos (Olive; Bean, 1999).

Os marcadores são ferramentas rápidas e eficientes para a pesquisa genômica, pois permitem a detecção de polimorfismos no DNA independente do ambiente (Sousa, 2010). Com base nesse polimorfismo, pode-se inferir a relação entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo. Dentre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como SSRs ("Simple Sequence Repeat"), são a primeira escolha para pesquisas aplicadas e genéticas, principalmente devido à sua natureza multialélica, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura ampla do genoma, além do processo ser iniciado com pequenas quantidades de DNA (Lins, 2018).

Aguiar *et al.* (2013) descreveram a diversidade genética de linhagens brasileiras de *E. canis*, entretanto os mecanismos responsáveis por essa divergência ainda não foi elucidado. O estudo genético das sequências se faz necessário, uma vez que esta diversidade ocorre nos genes que codificam as proteínas. A investigação do controle da expressão gênica, fornece informações sobre as proteínas que estão sendo expressas, qual o nível e o momento desta expressão, representando um elo entre o genótipo e o fenótipo de um organismo (Lins, 2018).

Devido à sua alta antigenicidade e à grande similaridade entre diferentes sequências norte-americanas, a proteína p28 de *E. canis* tem sido apontada como uma opção para uma futura vacina (McBride *et al.*, 2000). Além disso, um ensaio de PCR baseado no gene p28 foi desenvolvido para detecção de *E. canis* (Nakaghi *et al.*, 2010).

As proteínas TRP36 e TRP19 têm seus genes amplamente estudados e utilizados para identificar as diferentes variantes dentro da espécie de *E. canis*. Ambas são glicoproteínas espécie-específicas recombinantes e imunorreativas (Cárdenas *et al.*, 2007). O gene que codifica a proteína TRP19 é mais conservado, o que favorece seu estudo para fabricação de vacinas e testes sorológicos mais sensíveis quando relacionados a esta proteína (Taqes *et al.*, 2016). A TRP19 consiste em 137 aminoácidos e está associada a membrana da mórula formada no citoplasma da célula do hospedeiro (McBride *et al.*, 2007).

Na fase aguda, a glicoproteína TRP36 é exposta na membrana da bactéria, sendo secretada para o citoplasma do hospedeiro (Taqes *et al.*, 2016). Três regiões distintas são codificadas pelo gene da proteína TRP36, sendo: A 5'-terminal (429pb) seguida de uma região de repetição em tandem não variável formada por 9 aminoácidos e rica em serina (TEDSVSAPA) onde T=treonina, E=glutamato, D=aspartato, S=serina, V=valina, A=alanina e P=prolina, e uma 3'-terminal (80-93pb) (Doyle *et al.*, 2006). Dependendo do isolado, o número de sequências em tandem varia de quatro a dezoito cópias (McBride *et al.*, 2003).

A análise filogenética de genes TRP36 de *E. canis* identificou 4 genogrupos: genogrupo dos Estados Unidos (EUA) identificado na América do Norte, Brasil, Nigéria, Camarões, Espanha, Turquia e Israel (Ferreira *et al.*, 2014; Kamani *et al.*, 2013; Zweygarth *et al.*, 2014), o genogrupo de Taiwan (TWN) descrito na África do Sul, Tailândia, Turquia e Taiwan (Nambooppha *et al.*, 2018; Hsieh *et al.*, 2010), o genogrupo Brasil (BR) observado nas regiões centro-oeste, norte, sul do Brasil e Turquia (Aguiar *et al.*, 2013; Aktas e Özübek, 2019) e genogrupo Costa Rica (CR), detectado recentemente em doadores de sangue humano da Costa Rica (Bouza-Mora *et al.*, 2016) e descrito em caninos de quatro assentamentos peruanos (Geiger *et al.*, 2018).

2.7 Alterações hematológicas nas hemoparasitoses de cães

2.7.1 Erliquiose monocítica canina

A doença multissistêmica conhecida como Erliquiose Monocítica Canina (EMC), provocada por *E. canis*, apresenta gravidade variável conforme o estágio clínico. A patogênese da EMC envolve um período de incubação que varia entre 8 e 20 dias, seguido por fases distintas: aguda, subclínica (assintomática) e crônica (Diniz; Aguiar, 2022).

O período da fase aguda da doença vai de duas a quatro semanas, onde os microrganismos se multiplicam nas células mononucleares circulantes e nos tecidos do sistema fagocítico monocitário do fígado, baço e linfonodos, causando aumento dos mesmos (Aziz *et al.*, 2022). Ainda assim, as células infectadas são transportadas via corrente sanguínea para pulmões, rins e meninges (Ferreira, 2012). As alterações hematológicas observadas incluem trombocitopenia e discreta anemia e leucopenia (Harrus *et al.*, 2009). Muitos mecanismos podem estar relacionados a anemia como hemólise, hipoplasia ou aplasia medular após a supressão de citocinas da hematopoiese na medula óssea (De Tommasi *et al.*, 2014). O achado mais comum durante as três fases da EMC é a trombocitopenia, devido ao aumento do consumo, destruição imunomediada, sequestro de plaquetas no baço e diminuição da produção da medula óssea hipoplásica, podendo também ocorrer trombocitopenia mediada por citocinas (Diniz; Aguiar, 2022).

A fase aguda frequentemente é autolimitante, apresentando uma recuperação clínica com a doença, tornando-se subclínica ou assintomática, com duração de 40 a 120 dias, ou até mesmo por anos (Aguiar *et al.*, 2007; Little, 2010, Vieira *et al.*, 2011). O animal se apresenta clinicamente recuperado, mas podem apresentar trombocitopenia leve, anemia não regenerativa, leucopenia (Waner *et al.*, 1997; Woody e Hoskins, 1991; Aguiar *et al.*, 2007) e hiperglobulinemia, que sugere resposta imunológica exagerada com eficiência inadequada (Waner *et al.*, 1997; Woody e Hoskins, 1991).

Ehrlichia canis poderá ser eliminada nos animais imunocompetentes, ou então entrará na fase crônica, onde os sinais reaparecem mais brandos ou mais severos a depender da cepa, da raça do cão, da idade, da imunocompetência e coinfeção com outros patógenos. Todas as fases incluem depressão, anorexia, e perda de peso em mais de 50% dos casos, além de tendências hemorrágicas, linfadenomegalia, esplenomegalia, sinais oculares e neurológicos, sendo dificultoso a correlação de sinais com uma fase em particular (Woody e Hoskins, 1991). As complicações da infecção crônica por *Ehrlichia canis* incluem glomerulonefrite e síndrome nefrótica, causadas pela deposição de complexos imunológicos, além da supressão da medula óssea, que resulta em pancitopenia e infecções secundárias. Nessa fase, *E. canis* dificilmente é detectada na circulação, mas pode ser localizado no baço, nos nódulos linfáticos e na medula óssea (Diniz & Aguiar, 2022).

2.7.2 Babesiose canina

A babesiose canina é causada por várias espécies de *Babesia*, sendo essas predominantemente, *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia Rossi*, *Babesia gibsoni* (Passos *et al.*, 2005).

As anormalidades hematológicas primárias são anemia e trombocitopenia (Moraes *et al.*, 2016), onde os cães infectados por *B. canis* podem apresentar anemia que varia de normocítica normocrômica a hipocrômica, sendo a primeira comumente de baixa intensidade nos primeiros dias após a infecção, podendo tornar-se macrocítica e hipocrômica à medida que a doença agrave (Dias; Ferreira, 2016). Além disso, cães infectados por *B. canis* podem apresentar anemia não-regenerativa, enquanto aqueles infectados por *B. vogeli* apresentam anemia regenerativa (Carli *et al.*, 2009). Reticulocitose é proporcional à gravidade da anemia

(Dias; Ferreira, 2016).

A trombocitopenia na doença tem sido descrita, onde acredita-se que os mecanismos mais prováveis são a destruição mediada por anticorpos e o consumo acelerado em decorrência de vasculite endotelial ou sequestro esplênico (Brandão; Hagiwara, 2002).

As anormalidades leucocitárias são inconsistentes. Leucocitose com neutrofilia, monocitose e linfopenia já foram relatados (Guimarães *et al.*, 2002), linfocitose e eosinofilia (Dias; Ferreira, 2016) e leucopenia (Schetters *et al.*, 2009) com neutropenia, monocitopenia e linfopenia (Furlanello *et al.*, 2005).

2.7.3 Trombocitopenia cíclica canina

Anaplasma platys é o agente da doença conhecida como trombocitopenia cíclica canina, que infecta plaquetas de cães (Ferreira, 2012). Seu principal achado laboratorial é a trombocitopenia, frequentemente com a observação de macroplaquetas circulantes (Xavier, 2011). A trombocitopenia cíclica é decorrente dos ciclos de parasitemia, que se repetem em um intervalo aproximado de 1 a 2 semanas, sendo mais grave durante a parasitemia inicial (Harvey, 2012). Além disso, anemia arregenerativa normocítica normocrômica, associada à anemia de inflamação, leucopenia (Harvey, 2006) e anemia macrocítica hipocrômica (Holanda *et al.*, 2019) já foram relatadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo e coleta das amostras

Duas mesorregiões foram utilizadas no presente estudo (Figura 2). A Mesorregião Metropolitana abriga um total de 30 municípios, ocupando uma área de 10.263 km². Possui uma altitude média de 177m e apresenta um clima principalmente tropical. Por outro lado, a Mesorregião do Sul Fluminense é constituída por 14 municípios, que se estendem por uma área de 7.966 km². Sua altitude média é de 357m e seu clima é predominantemente subtropical.

O estudo foi realizado no período de janeiro de 2022 a abril de 2023, sendo obtidas 400 amostras de sangue total de cães trombocitopênicos, de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, cedidas por um laboratório de patologia clínica, localizado no município de Paracambi – RJ.

Os animais que não possuíam volume suficiente de sangue total para a extração de DNA, os tutores foram contatados para disposição de uma nova coleta nos cães, conforme aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob nº. 7340040222, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ (Anexo I). Posto isso, sangue total de quatro animais foram coletados. No momento da coleta, os tutores foram informados a respeito da pesquisa e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi apresentado.

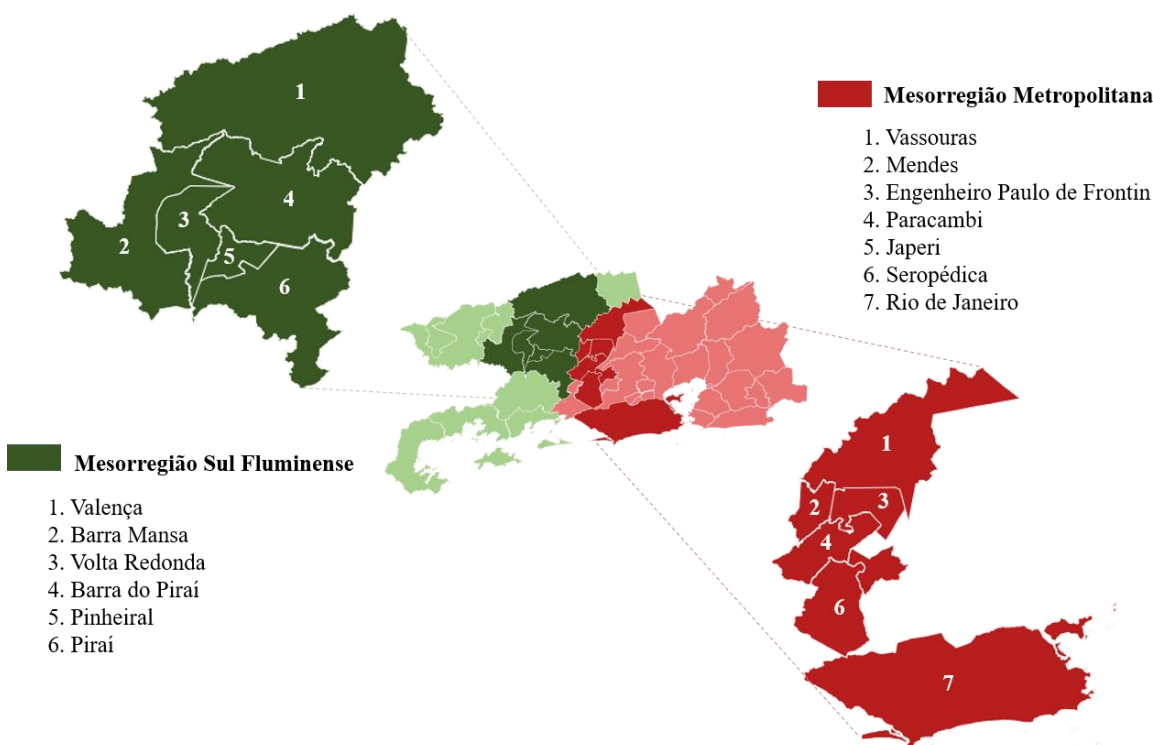


Figura 2. Localização das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, destacando as cidades que foram obtidas sangue de cães. Fonte: Arquivo pessoal

Para a obtenção de amostras sanguíneas, foi realizada a coleta de 3mL de sangue por venopunção cefálica. As amostras foram transferidas para tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e posteriormente armazenadas em recipiente refrigerado. Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), para posterior análises.

As amostras obtidas da parceria com o laboratório de patologia clínica juntamente com as coletas realizadas, totalizaram 404 amostras, sendo 274 amostras oriundas da mesorregião

Metropolitana e 130 amostras da mesorregião do Sul Fluminense.

Para realizar a análise molecular, a amostragem foi calculada baseando-se na prevalência esperada de 26,8% de cães trombocitopênicos infectados por *E. canis* no estado do Rio de Janeiro (Macieira *et al.*, 2005). Levando em conta uma margem de erro de 5%, e um nível de confiança de 95%, chegou-se ao cálculo mínimo de 302 amostras, conforme equação descrita por Sampaio (2002).

3.2 Análise hematológica

A análise hematológica foi realizada através do contador hematológico automático de células (Hemacounter VET – Vyttra Diagnósticos®). Os valores fornecidos pelo contador hematológico foram confirmados através do preenchimento por sangue em tubos capilares de microhematócrito, e disposto sobre uma lâmina de vidro uma gota da amostra para confecção do esfregaço sanguíneo. Seguidamente, as lâminas foram coradas em kit de coloração hematológico rápida – Panótico Rápido® - e observadas com auxílio de microscópio óptico em objetiva de imersão em um aumento de 1000x (L3000T® – Labor Import). A morfologia das células sanguíneas e leucometria específica, assim como a pesquisa de mórulas sugestivas de *E. canis*, foram obtidas através do esfregaço sanguíneo. A concentração de proteínas plasmáticas totais foi determinada através da técnica de refratometria.

Após realização do hemograma, uma alíquota foi separada e encaminhada para o Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Saúde Pública, UFRRJ, para análises moleculares.

3.3 Obtenção de informações sobre gênero, raça e idade

Durante a obtenção das amostras, informações sobre as características individuais de cada cão foram coletadas na base de dados do laboratório de patologia clínica. As características foram analisadas considerando as seguintes variáveis: Gênero (macho e fêmea), Raça (com raça definida e sem raça definida) e Idade (até 12 meses, entre 12 e 24 meses e acima de 24 meses).

3.4 Extração de DNA e verificação do gene endógeno

A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizada com kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega®) a partir de 300 µL de sangue total, seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras foram acondicionadas em microtubos de polipropileno, identificadas e armazenadas em freezer -20°C até o momento das análises moleculares.

A detecção de DNA amplificável foi verificada por meio de uma reação de PCR convencional visando o gene endógeno de mamíferos, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), amplificando um fragmento de 400 pares de base (pb). Foram utilizados os oligoiniciadores GAPDH-F (5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT 3') e GAPDH-R (5' CCAAAGTTGTCATGGATGACC 3') (Birkenheuer; Levy; Breitschwerdt, 2003). O volume final da reação foi de 25 µL, contendo 2 µL do DNA extraído acrescidos de 23 µL contendo 0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (GAPDH-F e GAPDH-R), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases. Água ultrapura livre de DNases foi utilizada como controle negativo.

A amplificação foi realizada em termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®), observando os seguintes padrões de termociclagem: 95°C por 2:30 minutos, seguido

por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 25 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. A partir disto, as amostras amplificadas foram submetidas aos ensaios de PCR específicos.

3.5 Detecção molecular de para ordem piroplasmida e *Anaplasma platys*

Com o intuito de fazer a análise dos achados hematológicos e associá-los com os animais positivos para *E. canis*, análises moleculares para ordem piroplasmida e *A. platys* foram realizadas, sendo excluídos do presente estudo os animais positivos para esses agentes.

Foi realizada nested-PCR para detecção de agentes da ordem piroplasmida com alvo no gene *18S rRNA*, onde foram utilizados os oligoiniciadores BTF1 (F-5' GGCTCATTACAACAGTTATAG 3') e BTR1 (R-5' CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC 3') na primeira reação, amplificando aproximadamente 930pb. Na segunda reação os oligoiniciadores foram: BTF2 (F 5' CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC 3') e BTR2 (F-5' GGACTACGACGGTATCTGATCG 3'), amplificando aproximadamente 800pb (Jefferies *et al.*, 2007). A primeira reação de PCR foi composta por 25 µL contendo 3 µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do Mix [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (BTF1 e BTR1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. As condições de termociclagem foram: 95°C por 2:30 seg, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58°C por 20 seg e 72°C por 30 seg, e extensão final a 72 °C por 5 min. Na segunda reação, 2 µL do produto da primeira reação foi adicionado a 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases, 5 µL de tampão da enzima 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (MgCl₂ Solution Promega®), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 2 µL de cada iniciador a 10 mM (BTF2 e BTR2) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase a 1 U (GoTaq® DNA Polymerase, Promega®), somando um volume final de 25 µL, com condições de termociclagem 95°C por 2:30 seg, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62°C por 20 seg e 72°C por 30 seg, e extensão final a 72 °C por 5 min. Uma amostra sabidamente positiva para *Babesia* sp. e água ultrapura livre de DNases foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Para a amplificação de *A. platys*, foram utilizados os oligoiniciadores *gltA*84F F - 5' GACCTACGATCCGGGATTCA-3' e *gltA*69R R - 5'-CCGCACGGTCGCTGTT-3', baseados no gene da citrato sintase (*gltA*), amplificando 580 pares de base (Silva *et al.*, 2016). O volume final de reação foi de 25µL, sendo 2 µL de DNA extraído acrescido a 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 3 µL de 25mM MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 2 µL de 200mM DNTP's, 1 µL de 10 pmol/µL de cada iniciador, 0,2µL (1U) de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e completando o volume final com água (q.s.p.). O programa do termociclador foi de 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 30seg, 60 °C por 30seg e extensão a 72°C por 40seg, com um ciclo de extensão final de 72 °C por 5 minutos. Uma amostra sabidamente positiva para *A. platys* e água ultrapura, livre de DNases, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.6 Detecção molecular de *Ehrlichia* spp.

Foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) visando o gene *dsb*, que amplifica aproximadamente 683pb, com o objetivo de realizar uma triagem das amostras positivas para o gênero *Ehrlichia* (Tabela 1). As reações foram realizadas utilizando os iniciadores *dsbF2* e *dsbR2* (Cabezas-Cruz *et al.*, 2012).

Os oligoiniciadores foram: *dsbF2* F - 5'CTTAGTAATACTAGTGGCAAGTTTTCCAC 3' e *dsbR2* R - 5' GTTGATATATCAGCTGCACCACCG 3'. O volume final de reação foi de 25µL,

sendo 2 µL de DNA extraído acrescido a 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de 25mM MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 2 µL de 200mM DNTP's, 2µL de 10 pmol/µL de cada iniciador, 0,2uL (1U) de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e completando o volume final com água (q.s.p.). As condições de termociclagem foram: 95°C por 2:30 seg, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 45 seg, e extensão final a 72 °C por 5 min.

O controle positivo foi obtido através de isolados de *E. canis* mantidos em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias – UFRRJ, e como controle negativo foi utilizado água ultrapura.

3.7 Detecção molecular de *Ehrlichia canis* utilizando os genes *p28* e *gp36*

Para a caracterização molecular, utilizou-se amostras positivas para *Ehrlichia* sp., onde oligoiniciadores específicos para *E. canis* baseados no gene *p28* foram empregados para amplificar um fragmento de 843pb e gene *TRP36* que amplifica um fragmento que varia de 800 a 1000pb (Tabela 1).

A reação foi feita com volume final de 25µL, sendo 2 µL de DNA extraído acrescido a 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 2,5 µL de 25mM MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 2 µL de 200mM DNTP's, 1,25µL de 10 pmol/µL de cada iniciador, 0,2uL (1U) de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e completando o volume final com água (q.s.p.). As condições de termociclagem foram: 95°C por 2:30 seg, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 50 seg, e extensão final a 72 °C por 5 min.

Para o gene *TRP36*, realizou-se semi-nested que consistiu na utilização de: 3 µL de DNA extraído acrescido a 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de 25mM MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 2 µL de 200mM DNTP's, 2µL de 10 pmol/µL de cada iniciador, 0,2uL (1U) de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e completando o volume final com água ultrapura (q.s.p.). Na segunda reação as quantidades utilizadas dos reagentes foram as mesmas, com exceção do DNA, pois foi utilizado 2µL de produto da primeira reação.

As condições de termociclagem de ambas as reações foram: 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 57°C por 30 seg e 72°C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 5 min.

Isolados de *E. canis*, obtidos a partir de sangue canino, mantidos em nitrogênio líquido no LDP – UFRRJ foram utilizados como controle positivo, enquanto que água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

Tabela 1. Conjuntos de oligoiniciadores específicos para os genes de *E. canis* utilizados para ensaios moleculares em sangue de cães trombocitopênicos.

Genes	Ensaio	Iniciadores de oligonucleotídeos	Tamanho produto	Referências
<i>dsb</i>	PCR	F5- CTTAGTAATACTAGTGGCAAGTTTCCAC-3 R5- GTTGATATATCAGCTGCACCACCG -3	683pb	Cruz <i>et al.</i> , 2012*
<i>p28</i>	PCR	F 5-ATGAATTGCAAAAAAATCTTATA-3 R 5-TTAGAAGTTAAATCTTCCTCC-3	843pb	Nakaghi <i>et al.</i> , 2010*
<i>TRP36</i>	PCR	F 5-TTTAAAACAAAATTAACACACTA-3 R 5-AAGATTAACCTTAATACTCAATATTACT-3	800 a 1000pb	Aguiar <i>et al.</i> , 2014*
	snPCR	R 5-CACACTAAAATGTATAATAAAGC-3		

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; snPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Semi-nested; bp: pares de bases.

*PCR realizada com adaptações.

3.8 Eletroforese e análise dos resultados

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) sob uma corrente de 75 V (5V/cm) por 90 minutos em TBE (Tris, borato e EDTA). Em seguida, foram corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados através de um transiluminador com luz ultravioleta (L-PIX Sti, Loccus). A fim de determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, eles foram comparados a um padrão de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready-To-Use, M1071, Sinapse Inc®).

3.9 Análise estatística

Para comparação das médias de valores dos parâmetros hematológicos entre os animais positivos e negativos para *E. canis* foi utilizado o teste shapiro-wilks e teste não paramétrico Wilcoxon. Além disso, foi utilizado proportion test – Software Stata16, que consiste no teste de proporção baseada na aproximação da distribuição normal de dados binomiais. O teste Kappa (IC 95%) foi empregado para avaliar a concordância entre as técnicas de diagnóstico (Fleiss *et al.*, 2003) e teste qui-quadrado foi aplicado para verificar a relação da positividade para *E. canis* com as variáveis sexo, raça, idade e alterações hematológicas, considerando um intervalo de confiança de 95%.

3.10 Sequenciamento genético e Análise filogenética

O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5µL do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular PPGCV/ UFRRJ. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa DNA Baser®.

O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado com as sequências obtidas neste estudo e sequências do GenBank utilizando o programa MAFFT, implementado no software

Jalview v.2.11 (Kato *et al.*, 2013, Waterhouse *et al.*, 2009). O modelo evolutivo mais adequado foi determinado usando o MEGA versão 11, utilizando o critério bayesiano (Tamura *et al.*, 2021). As relações filogenéticas foram estimadas usando a inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (ML) com o programa PhyML, que está implementado no SeaView v.5 (Gouy *et al.*, 2021) e no programa MEGA versão 11. O suporte estatístico dos clados foi medido por meio de uma busca heurística com 1000 replicatas de bootstrap.

No quadro 1, estão listados todos os códigos de acesso e o país de origem das sequências do gene *TRP36* utilizadas para o alinhamento e filogenia.

Quadro 1. Sequências do gene *TRP36* de *Ehrlichia canis* obtidos no Genbank para o estudo.

<i>TRP36</i>	Código de acesso
<i>Ehrlichia canis</i> - Jake EUA	DQ085427
<i>Ehrlichia canis</i> -Cuiaba Brasil	JX312079
<i>Ehrlichia canis</i> - Belem Brasil	JX429924
<i>Ehrlichia canis</i> - Londrina Brasil	JX312080
<i>Ehrlichia canis</i> -Monte Negro Brasil	JX312081
<i>Ehrlichia canis</i> - Monte Negro Brasil	JX312082
<i>Ehrlichia canis</i> – Florida EUA	DQ146152
<i>Ehrlichia canis</i> – Nigeria	JN982341
<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro Brasil	KF233414
<i>Ehrlichia canis</i> - São Paulo Brasil	DQ146154
<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro Brasil	MG584548
<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro Brasil	MG584545
<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro Brasil	KF233413
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	EF551366
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	EF651794
<i>Ehrlichia canis</i> - África	KC479020
<i>Ehrlichia canis</i> - África	KC479021
<i>Ehrlichia canis</i> – Colômbia	MN159558
<i>Ehrlichia canis</i> - Colômbia	MW229073

4 RESULTADOS

4.1 Detecção do DNA de *Ehrlichia canis* em sangue de cães trombocitopênicos

Todas as amostras do presente estudo amplificaram um fragmento de 400pb para o gene endógeno *GAPDH* (figura 3). A partir disso, as amostras foram submetidas à detecção molecular por gene *dsb* pela PCR convencional para detecção de *Ehrlichia* spp.. De um total de 404 amostras de sangue de cães trombocitopênicos do estado do Rio de Janeiro, 21,04% (85/404) amplificaram para *Ehrlichia* spp. (figura 4).

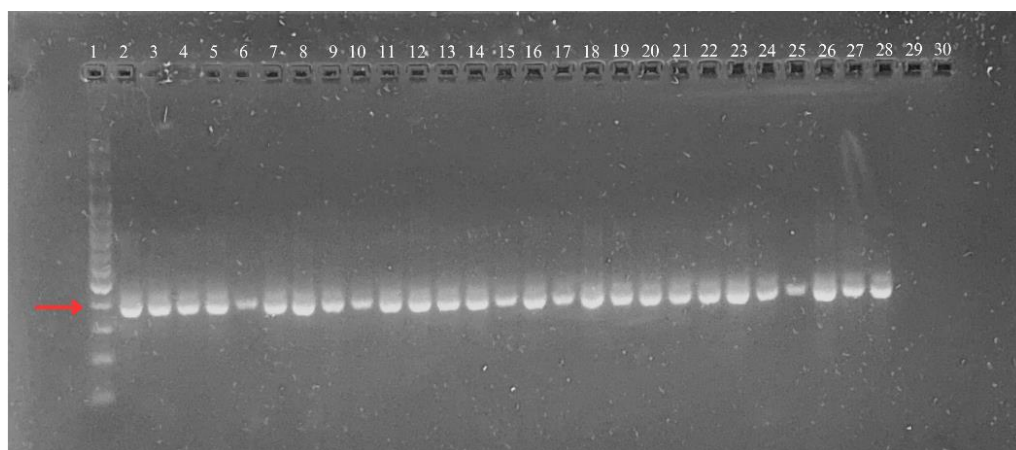


Figura 3. Representação dos produtos de PCR para o gene *GAPDH* de mamíferos (400pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder; Poços 2-28: amostras positivas; Poço 29: controle negativo.

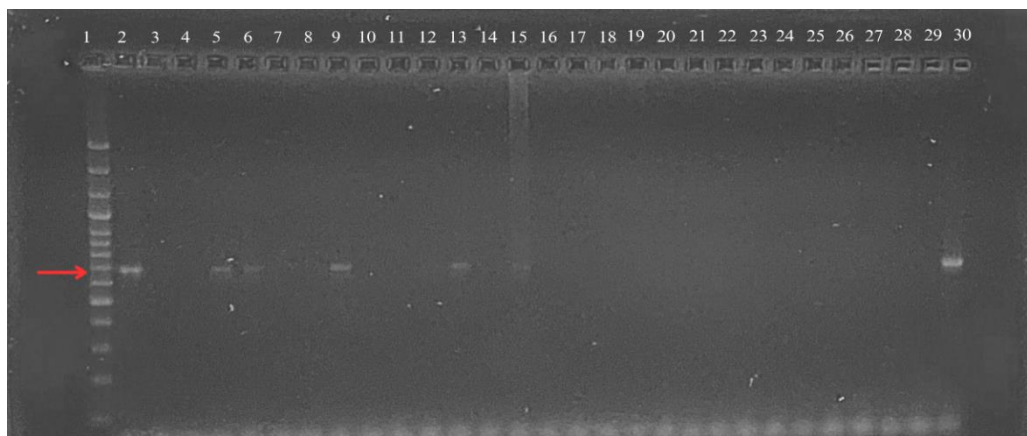


Figura 4. Representação dos produtos de PCR para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. (683pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder; poços 2, 5, 6, 9, 13 e 15: amostras testes positivas; poços 3-4, 7-8, 10-12, 14, 16-28: amostras testes negativas; poço 29: controle negativo; poço 30: controle positivo.

As amostras que amplificaram no gene *dsb* foram submetidas ao gene *p28* de *E. canis*, onde todas as amostras (85/85) amplificaram um fragmento de 843pb (figura 5). Quando submetidas ao gene *TRP36* de *E. canis*, houve amplificação de 34,11% (29/85) das amostras (figura 6). Para o sequenciamento e análise da diversidade genética, foram utilizados produtos

de 15 amostras para o gene *TRP36*.

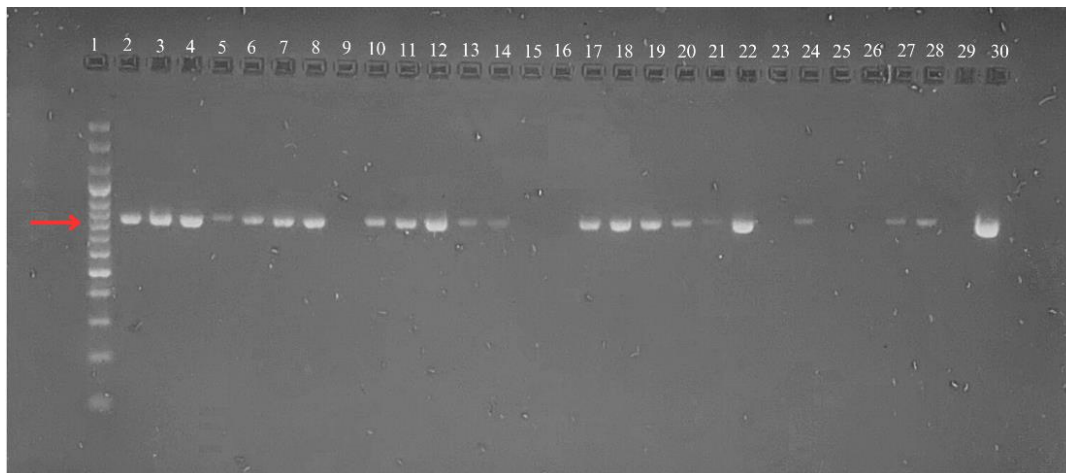


Figura 5. Representação dos produtos de PCR para o gene *p28* de *E. canis* (843pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2-8, 10-14, 17-22, 24, 27-28: Amostras testes positivas. Poço 9, 15-16, 23, 25-26, 29: Controles negativos; Poço 30: Controle positivo.

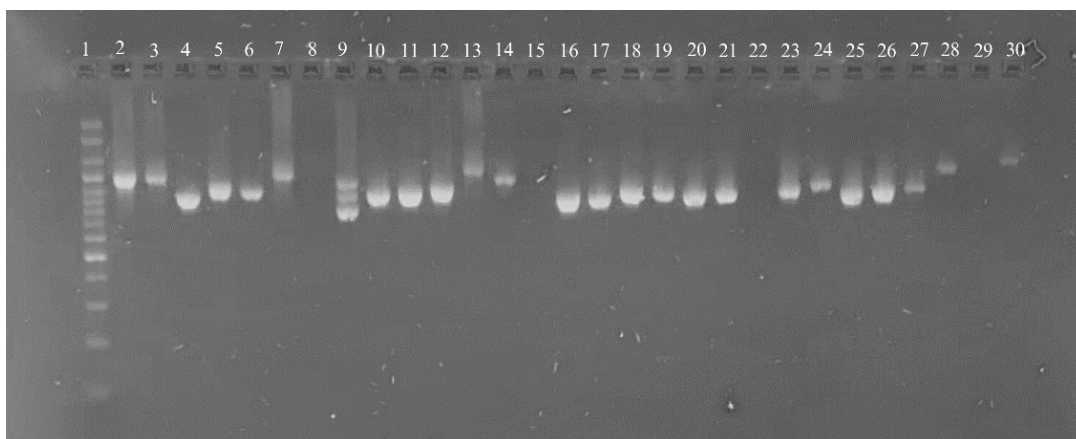


Figura 6. Representação dos produtos de PCR para o gene *TRP36* de *E. canis* (800-1000pb), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2-7, 10-14, 16-21, 23-28: Amostras testes positivas. Poço 9: Amostra teste excluída do estudo. Poço 8, 15, 22, 29: Controles negativos; Poço 30: Controle positivo.

A frequência em cada mesorregião para as amostras de sangue de cães trombocitopênicos positivos para *E. canis*, foi de 76,47% (65/85) para a Metropolitana e 23,53% (20/85) para a Sul Fluminense.

4.2 Análise do alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *TRP36* de *E. canis*

Na análise de identidade das sequências de nucleotídeos obtidas através do gene *TRP36*, as sequências do presente estudo apresentaram variação de 99,04% a 100% quando comparadas com sequências de *E. canis* de Cuiabá, Rio de Janeiro, Monte Negro, Belém e Colômbia (Tabela 1).

Tabela 1. Similaridade entre as sequências de *TRP36* de *Ehrlichia canis* do estudo e sequências depositadas no Genbank.

Sequências do estudo	Espécie/localidade	Nº. acesso Genbank	Homologia (%)	Query Coverage (%)
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 232SF	<i>Ehrlichia canis</i> – Cuiabá/Brasil	JX312077	100	96
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 414MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro/Brasil	KF233413	99,39	99
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 419MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro/Brasil	KF233413	99,23	99
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 275SF	<i>Ehrlichia canis</i> – Rio de Janeiro/Brasil	KF233413	99,68	98
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 411MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Monte Negro/Brasil	JX312081	99,04	100
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 184MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Belém/Brasil	JX429924	99,83	100
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 381MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Cuiabá/Brasil	JX312079	99,88	100
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 431MT	<i>Ehrlichia canis</i> - Colômbia	MN159558	99,71	93
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 430MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Colômbia	MN159558	99,41	94
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 255MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Monte Negro/Brasil	JX312082	99,41	99
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 345MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Cuiabá/Brasil	JX312079	99,58	99
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 385MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Colômbia	MN159558	99,88	99
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 402MT	<i>Ehrlichia canis</i> – Cuiabá/Brasil	JX312079	99,56	99
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 416MT	<i>Ehrlichia canis</i> - Colômbia	MN159558	99,71	100
<i>Ehrlichia canis</i> isolate 378MT	<i>Ehrlichia canis</i> - Cuiabá/Brasil	JX312079	99,59	97

Para a análise das sequências do *TRP36*, os nucleotídeos foram traduzidos em aminoácidos para identificar a região em tandem. Quatro sequências codificaram nove aminoácidos (TEDSVSAPA) e o número de repetições variou entre 5 e 12 cópias. As sequências que apresentavam a região em tandem “TEDSVSAPA”, utilizou-se como referência a sequência *Ehrlichia canis* Jake-EUA (DQ085427), observando na cadeia de aminoácidos 17 pontos de polimorfismo entre os aminoácidos 11 e 79, como demonstrado na tabela 2.

A sequência *Ehrlichia canis* strain Cuiabá 1 (JX312079), foi utilizada como referência para comparação com as sequências do presente estudo, cujas 11 sequências codificaram a região em tandem “ASVVPEAE” com o número de repetições variando entre 3 a 22 cópias. Além disso, 7 pontos de polimorfismo na cadeia de aminoácidos foram observados (tabela 3).

Tabela 2. Diferenças de aminoácidos do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre as sequências de *E. canis* (TEDSVSAPA) obtidas de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e sequência referência depositada no Genbank.

Sequências	Posição do aminoácido ^a																			TRP*
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	25	36	38	43	47	49	50	79	145-240
<i>E. canis</i> strain Jake (DQ085427)	L	H	L	T	-	T	E	I	T	N	I	H	G	S	E	E	H	P	D	TEDSVSAPA ¹³
<i>Ehrlichia canis</i> 232SF	-	G	.	N	V	V	Q	G	S	G	N	TEDSVSAPA ⁵
<i>Ehrlichia canis</i> 275SF	S	I	F	K	Q	Q	.	.	.	G	.	N	V	V	Q	G	S	G	N	TEDSVSAPA ¹²
<i>Ehrlichia canis</i> 414MT	.	.	F	K	Q	Q	K	L	Q	V	F	N	V	V	Q	G	S	G	N	TEDSVSAPA ¹²
<i>Ehrlichia canis</i> 419MT	-	K	K	T	.	G	.	N	V	V	Q	G	S	G	N	TEDSVSAPA ¹²

^aPosição baseada na sequência referência DQ085427. Os pontos “.” Representam regiões conservadas.

Tabela 3. Diferenças de aminoácidos do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre as sequências de *E. canis* (ASVVPEAE) obtidas de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e sequência referência depositada no Genbank.

Sequências	Posição do aminoácido ^a							TRP*
	28	29	39	52	94	100	128	145-240
<i>Ehrlichia canis</i> strain Cuiabá 1 (JX312079)	I	H	G	G	A	D	R	ASVVPEAE ¹³
<i>Ehrlichia canis</i> 411MT	ASVVPEAE ¹⁰
<i>Ehrlichia canis</i> 184MT	ASVVPEAE ¹²
<i>Ehrlichia canis</i> 381MT	ASVVPEAE ¹³
<i>Ehrlichia canis</i> 431MT	ASVVPEAE ¹⁰
<i>Ehrlichia canis</i> 430MT	M	Y	.	D	.	N	.	ASVVPEAE ⁹
<i>Ehrlichia canis</i> 255MT	M	.	.	D	.	N	.	ASVVPEAE ³
<i>Ehrlichia canis</i> 345MT	M	.	.	D	.	N	.	ASVVPEAE ²²
<i>Ehrlichia canis</i> 385MT	ASVVPEAE ¹⁵
<i>Ehrlichia canis</i> 402MT	M	.	.	D	.	N	.	ASVVPEAE ¹⁰
<i>Ehrlichia canis</i> 416MT	.	.	D	ASVVPEAE ¹¹
<i>Ehrlichia canis</i> 378MT	.	.	.	D	V	.	L	ASVVPEAE ¹²

^aPosição baseada na sequência referência JX312079. Os pontos “.” Representam regiões conservadas.

Na análise de agrupamento do gene *TRP36*, foi possível observar que 11 sequências do estudo se agruparam com sequências brasileiras dos estados do Paraná (JX312080), Mato Grosso (JX312079), Rio Grande do Sul (JX312081) e Pará (JX429924). Em contrapartida, quatro amostras se agruparam com sequência do estado do Rio de Janeiro (KF233413) (Figura 8).

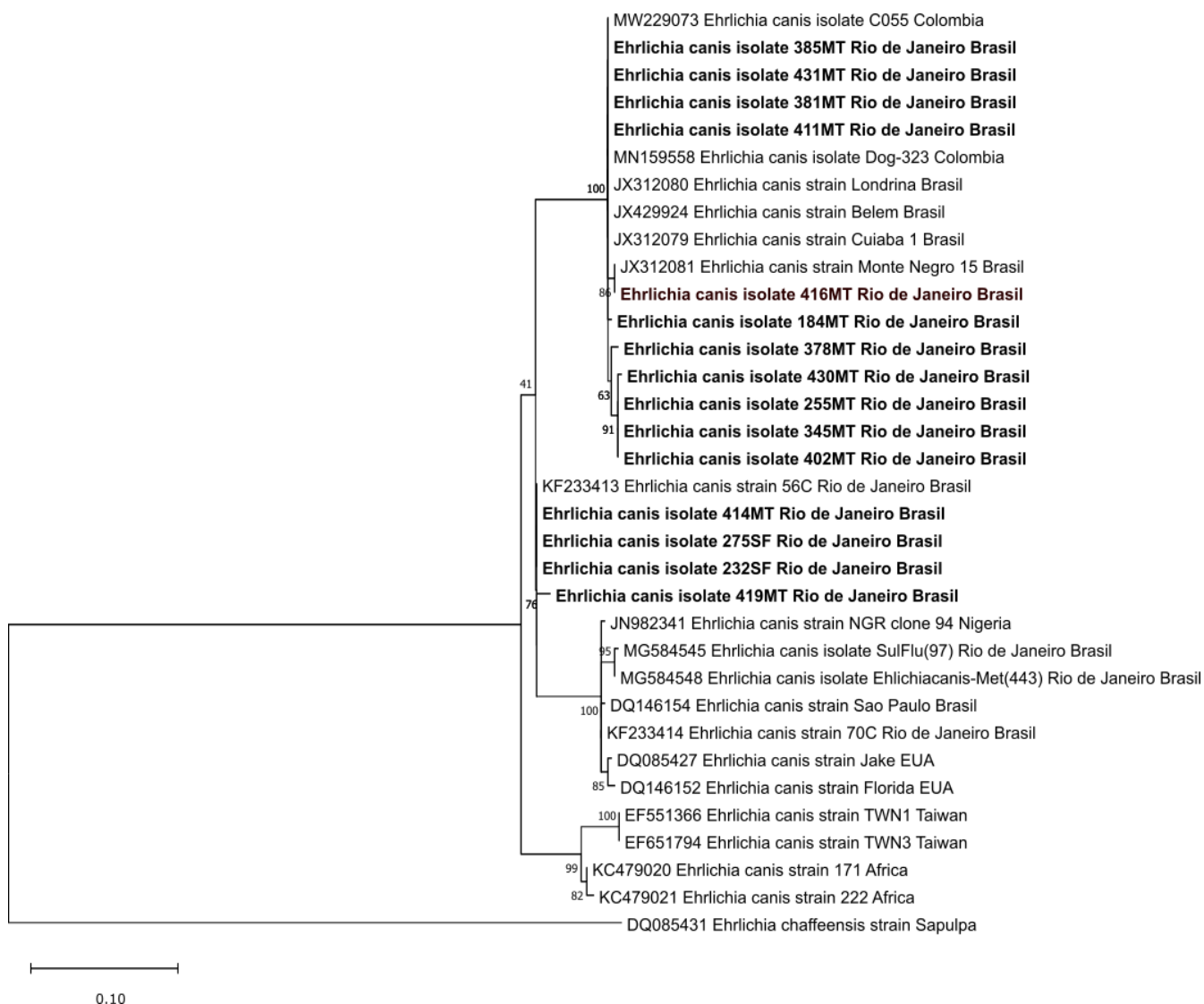


Figura 7. Dendrograma baseado nas sequências de *Ehrlichia canis* a partir do gene *TRP36* das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendrograma foi construído usando o método de Máxima Verossimilhança. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA 11. Como *outgroup* foi utilizado a sequência *Ehrlichia chaffeensis* strain Sapulpa (DQ085431).

4.3 Análise hematológica dos cães trombocitopênicos positivos para *E. canis*

Com o intuito de fazer análise das alterações hematológicas dos animais trombocitopênicos positivos somente para *E. canis*, nove animais que possuíam coinfeção com piroplasmida e/ou *A. platys* foram excluídos do estudo. Desta maneira, para esta análise, foram

utilizados 76 cães trombocitopênicos naturalmente infectados por *E. canis* e 283 amostras sanguíneas trombocitopênicas consideradas negativas para os agentes, totalizando uma amostragem de 359 cães.

Na tabela 4, estão apresentados os resultados hematológicos quantitativos com média, desvio padrão e amplitude dos animais trombocitopênicos positivos e negativos para *E. canis*. A análise estatística evidenciou uma diferença no valor do hematócrito, por conseguinte, no número de hemácias, hemoglobina e CHCM, além do número de eosinófilos e concentração de proteínas plasmáticas entre os animais positivos e negativos.

Tabela 4. Média, desvio padrão e amplitude dos valores hematológicos quantitativos dos animais trombocitopênicos positivos e negativos para *E. canis*.

Parâmetro	Animais positivos (N=76)		Animais negativos (N=283)	
	Média ± DP	Mín. – Máx.	Média ± DP	Mín. – Máx.
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	4,97 ± 1,38 ^a	1,5 – 7,85	5,57 ± 1,65 ^b	1,20 – 9,69
Hemoglobina (g/dL)	9,9 ± 2,8 ^a	2,8 – 15,3	11,8 ± 3,4 ^b	2,5 – 20,3
Hematócrito (%)	30,0 ± 9,3 ^a	10 – 49	36,1 ± 10,0 ^b	8 – 60
VCM (fL)	64,3 ± 2,8 ^a	60,2 – 75,2	65,3 ± 4,2 ^a	60,0 – 76,9
CHCM (%)	32,1 ± 1,3 ^a	28,0 – 35,7	32,8 ± 1,2 ^b	30,8 – 36,0
Leucometria global (/μL)	10.225 ± 5.067 ^a	1.300 – 30.000	10.734 ± 6.261 ^a	500 – 38.000
Basófilos (/μL)	0	0	0	0
Eosinófilos (/μL)	219 ± 262 ^a	0 – 1540	442 ± 553 ^b	0 – 3.256
Bastões (/μL)	41 ± 129 ^a	0 – 900	30 ± 98 ^a	0 – 730
Segmentados (/μL)	7.607 ± 4.251 ^a	0 – 27.600	7.621 ± 5.147 ^a	0 – 33.060
Linfócitos (/μL)	1.815 ± 1.337 ^a	0 – 5.796	2.188 ± 2.122 ^a	0 – 16.900
Monócitos (/μL)	512 ± 641 ^a	0 – 4080	430 ± 509 ^a	0 – 3.585
Plaquetas (x10 ³ /μL)	107,6 ± 40,6 ^a	15,0 – 188,0	125,5 ± 94,0 ^a	19,0 – 120,0
PPT (g/dL)	6,7 ± 1,2 ^a	4,0 – 12,0	7,9 ± 1,5 ^b	4,4 – 12,4

Letras diferentes na horizontal indicam diferença estatística (p<0,05).

NE: Não encontrados

As alterações hematológicas presentes nos cães positivos para *E. canis* também foram estudadas, comparando-as com as alterações dos cães trombocitopênicos negativos, a fim de verificar sua relevância para o diagnóstico. Foram utilizados os intervalos de referência disponíveis em literaturas de referência (Jain, 1983; Rizzi; Meinkoth; Clinkenberd, 2010). Considerando as alterações hematológicas, a anemia, hiperproteinemia e a presença de monócitos ativados foram as alterações que tiveram associação significativa.

Tabela 5. Alterações hematológicas observados em cães trombocitopênicos naturalmente infectados por *E. canis* e comparação com animais trombocitopênicos negativos.

Alteração	Total de animais		<i>E. canis</i>		Negativos		<i>p</i> -valor
	n/N	(%)	n/N	(%)	n/N	(%)	
Anemia*	140/359	39,00	46/76	60,53	94/283	33,22	<0,001**
Leucocitose	47/359	13,10	5/76	6,58	42/283	14,84	0,058
Leucopenia*	25/359	6,96	2/76	2,63	23/283	8,13	0,094
Eosinofilia	26/359	7,24	2/76	2,63	24/283	8,48	0,081
Eosinopenia*	43/359	11,98	11/76	14,47	32/283	11,30	0,450
DNNE	2/359	0,51	1/76	1,32	1/283	0,35	0,317
Neutrofilia	64/359	17,83	9/76	11,84	55/283	19,43	0,124
Neutropenia*	8/359	2,03	-	-	8/283	2,51	-
Linfocitose	29/359	7,34	4/76	5,26	25/283	7,84	0,311
Linfopenia*	128/359	35,65	31/76	40,79	97/283	34,28	0,293
Monocitose	20/359	5,57	5/76	6,58	15/283	5,30	0,666
Pancitopenia	46/359	12,81	10/76	13,16	36/283	12,72	0,919
Hiperproteinemia	115/359	32,03	7/76	9,21	108/283	38,16	<0,001**
Hipoproteinemia	16/359	4,46	6/76	7,89	10/283	3,18	0,110
Monócitos Ativados	50/359	13,93	16/76	21,05	34/283	12,01	0,0433**
Neutrófilos tóxicos	2/359	0,56	1/76	1,32	1/283	0,35	0,317
Macroplaquetas	53/359	14,76	16/76	21,05	37/283	13,07	0,0817

*Em animais que não apresentaram pancitopenia; n: quantidade de animais onde a alteração foi observada; N: total de animais trombocitopênicos avaliados; (%) percentual de observação da alteração;

**Associação estatística significativa entre a infecção por *E. canis* e a respectiva alteração clínico-laboratorial, pelo teste Qui-quadrado utilizando $\alpha=0.05$.

4.4 Análise das inclusões sugestivas de *E. canis* em esfregaço sanguíneo

Considerando a pesquisa de hemoparasitos em esfregaço sanguíneo, foi possível observar que 2,72% (11/404) dos cães apresentavam inclusões basofílicas intracitoplasmáticas em células mononucleares (figura 7) e plaquetas. Porém, nas análises moleculares 21,04% (85/404) das amostras apresentaram amplificação, através de PCR para o gene *dsb*, demonstrando concordância fraca entre as técnicas diagnósticas (tabela 6).

Constatou-se que sete amostras que continham inclusões basofílicas em monócitos, apresentaram positividade para *E. canis* na PCR e três foram negativas no diagnóstico molecular. Além disso, uma amostra positiva na PCR para *E. canis* apresentava inclusão em plaquetas, sendo negativa para *A. platys* na PCR.

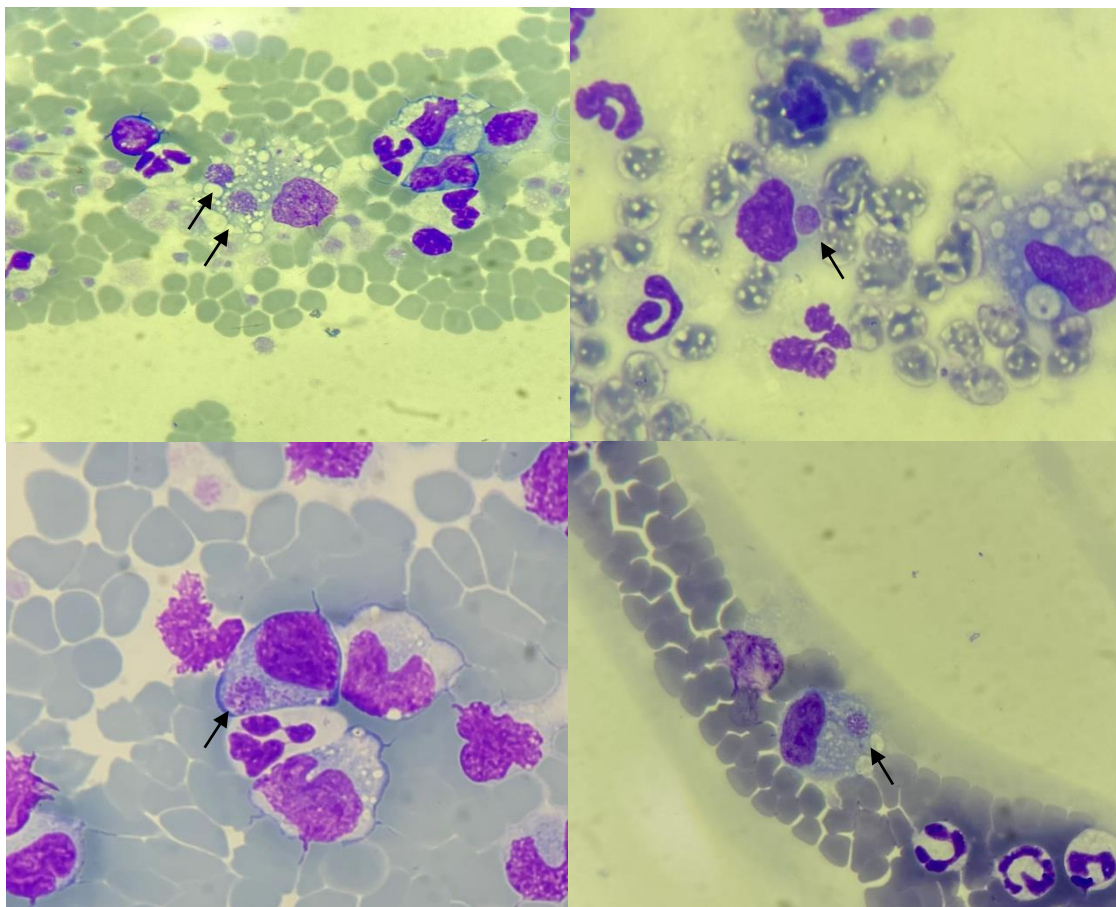


Figura 9. Esfregaço sanguíneo de amostras de cães trombocitopênicos apresentando inclusões basofílicas sugestivas de mórulas de *E. canis* (setas pretas), corados por Panótico Rápido®, microscopia óptica, objetiva em óleo de imersão de 100x. Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 6. Análise da discordância entre o teste citológico e PCR, comparando os resultados das amostras trombocitopênicas utilizadas no presente estudo.

Diagnóstico Citológico	Diagnóstico Molecular		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	8	3	11
Negativo	77	316	394
Total	85	319	404
Kappa	0,124 [IC 95%: 0,035;0,213]		

4.5 Análise das variáveis extrínsecas dos cães trombocitopênicos à *Ehrlichia canis*

Quanto as variáveis associadas a positividade, na tabela 11, está demonstrada a relação do gênero com a positividade, onde os machos apresentaram um percentual de 20,39% (42/206) e as fêmeas 21,72% (43/198), não havendo diferença estatística significativa ($=0,743$).

Tabela 7. Frequência de positividade de sangue de cães trombocitopênicos para *E. canis*, através da PCR e o gênero.

Gênero	N total	PCR positivos		χ^2	p (valor)*
		N	(%)		
Macho	206	42	20,39	0,107	0,743
Fêmea	198	43	21,72		
TOTAL	404	85	21,04		

A relação entre a definição racial com a positividade, está demonstrada na Tabela 12. Os animais sem raça definida (SRD) (20,71%, n=41/198) apresentaram menor percentual quando comparados aos animais com raça definida (CRD) (21,36%, n=44/206). Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre eles (p=0,872).

Tabela 8. Frequência de positividade de sangue de cães trombocitopênicos para *E. canis*, através da PCR e o tipo racial.

Definição racial	N total	PCR positivos		χ^2	p (valor)*
		N	(%)		
CRD	206	44	21,36	0,025	0,872
SRD	198	41	20,71		
TOTAL	404	85	21,04		

Em relação a idade dos animais, os mesmos foram divididos em animais até 12 meses de idade (36,63%, n=37/101), entre 12 e 24 meses (25%, n=10/40) e animais com mais de 24 meses (14,45%, n=38/263) (Tabela 13). A estatística demonstrou que a positividade para *E. canis* pelas técnicas empregadas no estudo, em animais de 0-12 é estatisticamente maior que o grupo >24, mas igual ao grupo >12-24 meses (p<0,001).

Tabela 9. Frequência de positividade de sangue de cães trombocitopênicos para *E. canis*, através da PCR e a idade.

Idade (meses)	N total	PCR positivos		χ^2	p (valor)*
		N	(%)		
0-12	101	37	36,63	22,03	<0,001
>12 -24	40	10	25		
>24	263	38	14,45		
TOTAL	404	85	21,04		

5 DISCUSSÃO

Observa-se a ocorrência de *E. canis* em cães trombocitopênicos das duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Estudos na região Metropolitana demonstram uma variedade na frequência de positividade para o agente da erliquiose monocítica canina, onde Macieira *et al.* (2005), Ferreira *et al.* (2014) e Lins *et al.* (2019), encontraram através de técnicas moleculares, positividade de 16%, 5% e 59,29% (67/113), respectivamente. A partir dos animais positivos, Lins *et al.* (2019) observaram uma frequência de 13,27% (15/113), na região Sul Fluminense, e no presente estudo a positividade a partir dos animais trombocitopênicos positivos nesta mesma região foi de 23,53% (20/85).

Paulino e seus colaboradores (2018), avaliando a presença de *E. canis* na região sudeste do Rio de Janeiro, encontraram uma prevalência de 24,8% dos cães positivos em uma população de 390 animais. Por outro lado, Macieira *et al.* (2005) encontraram uma frequência de 32,1% de positividade pelo PCR em cães trombocitopênicos do Rio de Janeiro e Dagnone *et al.* (2003), observaram que 19,7% dos cães trombocitopênicos tinham *E. canis*, resultado semelhante ao presente estudo, onde a frequência de positividade para o agente etiológico foi de 21,04%. Comparando os dados com outras cidades do Brasil, Ueno *et al.* (2009) em um estudo realizado em cães atendidos no Hospital Veterinário de Botucatu, identificaram uma positividade em 40% dos animais através da técnica de PCR. No Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, região Sul de São Paulo, 16,7% (9/54) dos cães foram positivos no diagnóstico molecular (Queiroz *et al.*, 2022). A frequência de positividade do presente estudo em comparação a estudos mundiais, possui variação, Navarrete *et al.* (2018) descreveram um percentual de 47,35% em Cuba, Mittal *et al.* (2017) observaram uma frequência de 5,78% na Índia e Cicuttin *et al.* (2016) relataram positividade de 6,7% em Buenos Aires. A oscilação de positividade nos animais pode ser influenciada por condições climáticas, distribuição do vetor, população estudada, habitat e comportamento animal, assim como a metodologia aplicada na investigação do agente (Dagnone *et al.*, 2001).

As sequências do gene *p28* possuem um relevante grau de conservação, sendo útil para produção de vacinas e padronização de testes de imunodiagnóstico (McBride *et al.*, 1999; Nakaghi *et al.*, 2010). As sequências obtidas por Lins *et al.* (2019) nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, revelaram alto grau de identidade com amostras de Jaboticabal-SP (Brasil), Carolina do Norte, Oklahoma e Louisiana (provindas dos EUA). Além disso, este gene demonstrou alta sensibilidade para detecção de *E. canis*, uma vez que todas as amostras submetidas ao gene *dsb* para o gênero *Ehrlichia*, também amplificaram no gene *p28*.

Analisando o gene *TRP36*, as amostras do presente estudo apresentaram diversidade genética entre si, assim como das sequências descritas por Ferreira *et al.* (2014) e Lins *et al.* (2019) nas mesorregiões do Rio de Janeiro. Não obstante, na reconstrução filogenética observou-se que mesmo que as mesorregiões fossem próximas, as sequências foram diferentes, principalmente na mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, diferindo do estudo de Lins *et al.* (2019) que identificaram 100% de similaridade das sequências obtidas nas mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana.

A região de repetição em tandem para TEDSVSAPA em quatro amostras, variou entre 5 (232SF) a 12 cópias (275F, 414MT e 419MT). Em estudos realizados no estado do Rio de Janeiro, Ferreira *et al.* (2014) descreveram sequências variando de 5 a 8 cópias e Lins *et al.* (2019) relataram sequências em diferentes mesorregiões com 11 cópias. Zweygarth *et al.* (2014) observaram sequências que continham 7 (África do Sul 222), 8 (Espanha 105) e 16 (África do Sul 171) repetições em tandem e Arroyave *et al.* (2020) descreveram sequências TEDSVSAPA variando entre 10 a 19 cópias. Porém, um híbrido (Cuiabá 16) foi relatado na região centro-oeste possivelmente criado através da associação entre duas linhagens de genogrupos diferentes (Aguilar *et al.*, 2013), à semelhança da sequência 56C, descrita por Ferreira *et al.* (2014), cujo

agrupamento se deu com a sequência Cuiabá 16 e a identidade entre as sequências da região N-terminal foi de 100%, propondo que o genogrupo brasileiro também pode estar circulando no estado do Rio de Janeiro, visto que as sequências de nucleotídeos Cuiabá 16 e 56C apresentavam 100% de identidade com as regiões N-terminais das sequências do genogrupo brasileiro (Cuiabá 1, Belém e Londrina). A sequência de repetição ASVVPEAE é correspondente ao genogrupo brasileiro (BR) e foi descrito no Brasil nas regiões Norte e Sul apresentando de 6 a 15 cópias (Aguiar *et al.* 2013). Cães colombianos também apresentaram a repetição ASVVPEAE com 15 sequências de repetição (Arroyave *et al.*, 2020). Entretanto, 11 amostras da mesorregião Metropolitana do nosso estudo, mostraram a região de repetição ASVVPEAE variando entre 3 a 22 cópias. Com isso, sugere-se a primeira descrição deste genogrupo com a repetição ASVVPEAE, no estado do Rio de Janeiro. É relevante ressaltar que o número de repetições em tandem pode conduzir a variações nas conformações da proteína, impactando, desse modo, tanto a sua função biológica quanto o seu comportamento (Alberts *et al.*, 2008) e estão associados a interações funcionais hospedeiro-patógeno, como adesão, internalização, nucleação de actina e evasão imunológica (McBride; Walker, 2011).

A alteração mais frequente na série vermelha dos pacientes com EMC foi a anemia, corroborando Borin e colaboradores (2009) que indicaram apenas a anemia como a alteração mais frequente no hemograma, sendo a anemia normocítica normocrômica a mais comum (Nakaghi *et al.*, 2008; Shipov *et al.*, 2008). Estudos afirmam que esse achado pode ser explicado pelo fato de a infecção poder ocasionar supressão difusa da eritropoiese na medula óssea (Witter *et al.*, 2013), à redução da eritropoiese ou reações de hipersensibilidade do tipo II, que podem provocar destruição e fagocitose das hemácias por monócitos/macrófagos. A anemia é uma alteração hematológica importante na infecção por *E. canis*, onde estudos realizados por Meneses *et al.* (2008), Moreira *et al.* (2003) e Cordeiro *et al.* (2023), identificaram tal alteração em 70,3%, 73% e 90,5% dos cães positivos, respectivamente.

O leucograma só apresentou diferença estatística em relação ao número de eosinófilos nos animais positivos e negativos. De acordo com Castro *et al.* (2004), é possível que as alterações nas contagens leucocitárias não se tornem claramente evidentes até a quarta semana de infecção, momento em que a leucopenia começa a ser uma alteração hematológica significativa. Eles também enfatizam que a eosinopenia e a linfopenia são achados típicos da fase aguda da doença. Por outro lado, Albernaz *et al.* (2007) mencionam que a contagem de neutrófilos pode ser influenciada pela fase da doença, assim como Stiles *et al.* (2000) descrevem que a contagem de monócitos pode variar no transcorrer da doença e estar consideravelmente aumentada na fase crônica.

Houve diferença estatística em relação as proteínas plasmáticas, onde a hiperproteinemia estava presente em um maior número de animais negativos para o patógeno. Harvey (2012) descreve que o aumento da produção de proteínas de fase aguda, imunoglobulinas e redução na síntese de albumina podem ser observadas em quadros inflamatórios. Além disso, outras causas de hiperproteinemia devem ser consideradas.

Na fase aguda da doença a trombocitopenia é a alteração mais evidente, envolvendo diversos mecanismos inflamatórios e imunológicos, que levam a um aumento do consumo de plaquetas devido a altos valores séricos de anticorpos IgG antiplaquetários, presentes no endotélio vascular inflamado, além da diminuição das plaquetas devido ao sequestro esplênico (Solano-Gallego, 2015). Porém, um único achado de trombocitopenia no hemograma, não deve ser considerado diagnóstico para infecção por *E. canis*. Todos os animais utilizados no estudo apresentavam trombocitopenia, entretanto 21,04% (85/404) dos cães foram positivos na técnica molecular utilizando sangue total, demonstrando que outras causas de trombocitopenias devem ser incluídas como diagnóstico diferencial. A diminuição na produção de plaquetas pode ser por consequência da hipoplasia de medula e suas causas são variadas, como por exemplo, irradiação corporal total, medicamentos, toxinas, agentes infecciosos e neoplasias (Baker,

2015). Cordeiro e colaboradores (2023) analisando as alterações hematológicas de cães positivos no diagnóstico molecular para agentes causadores de hemoparasitoses, constataram que 52,4% (11/21) dos cães não apresentavam trombocitopenia para *Ehrlichia canis*, demonstrando que os cães podem ter positividade para *E. canis* e não ter alteração nos valores plaquetários.

A presença de monócitos ativados em esfregaço sanguíneo entre os animais infectados e não infectados apresentou diferença estatística. Harrus e Waner (2011) descrevem que monócitos reativos podem estar presentes no esfregaço sanguíneo de animais infectados.

Comparando os valores hematológicos dos cães infectados pelos diferentes genótipos de *E. canis*, foi observado significância somente no VGM, entretanto, dentro do valor de referência para a espécie. Ferreira *et al.* (2014) avaliando dois animais infectados, observaram que o animal infectado com a cepa do genogrupo EUA, apresentava somente trombocitopenia com ausência de sinais clínicos da doença. Por outro lado, o animal infectado com a cepa híbrida, demonstrava sinais clínicos e achados hematológicos como anemia grave, trombocitopenia e leucocitose.

A técnica citológica para visualização de inclusões de *E. canis*, é uma técnica não onerosa, simples, empregada na rotina clínica, porém ela é mais eficiente na fase aguda doença e possui baixa sensibilidade, onde 0-10% dos esfregaços de sangue periférico apresentarão inclusões erliquiais (Diniz; Aguiar, 2022). O presente estudo encontrou inclusões basofílicas no citoplasma de monócitos e plaquetas em 2,72% (11/85) das amostras, porém com confirmação molecular para *E. canis* em oito animais. Na análise estatística, houve discordância entre as técnicas de diagnóstico utilizadas, uma vez que a técnica molecular se mostrou mais sensível que a citológica, fato observado por Nakaghi *et al.* (2008) que encontraram uma maior positividade em cães pela PCR (53,3% n=16/30) quando comparado com o esfregaço sanguíneo (3,3% n= 1/30).

Ressalta-se que plaquetas, grânulos azurófilos linfocíticos e material nuclear fagocitado, podem ser confundidos com inclusões erliquiais, assim como a infecção por outros agentes pertencentes a família Anaplasmataceae em monócitos, sendo muitas vezes confundidos pelo observador no momento da análise do esfregaço sanguíneo (Harrus; Waner, 2011), o que pode ter ocorrido nas três amostras que não amplificaram para *E. canis*. Ademais, uma amostra com inclusão em plaquetas foi positiva molecularmente para *E. canis* e negativa para *A. platys*, demonstrando que este agente pode infectar plaquetas, como observado por Dagnone *et al.* (2009) que encontraram animais positivos para *E. canis* com inclusões plaquetárias.

Analisando os aspectos epidemiológicos, as variáveis como gênero e raça, não tiveram associações com a positividade de *E. canis* em cães trombocitopênicos das mesorregiões Metropolitana e Sul Fluminense do estado do Rio de Janeiro. Esses dados corroboram estudos realizados por Aguiar *et al.* (2007b), Silva *et al.* (2010), Sousa *et al.* (2010), Cartagena Yarce *et al.* (2015) e Lins (2018) que não encontraram associação entre essas variáveis e a positividade para a riquetsia. Apesar de não ter observado diferença estatística entre as variáveis, a exposição de machos à *E. canis* foi discretamente maior, corroborando com Cusicanqui; Zuniga *et al.* (2020). Em relação a idade, Aguiar *et al.* (2007b) e Azevedo *et al.* (2011) não encontraram diferença estatística significativa na população estudada, porém Ueno *et al.* (2009) observaram que cães até 12 meses de idade apresentavam uma maior positividade para *E. canis*, assim como evidenciado no presente estudo, onde cães até 12 meses foram mais infectados pelo agente do que aqueles com idade superior a 24 meses. Ressalta-se que os dados do presente estudo foram analisados dentro de uma população amostral de animais trombocitopênicos.

6 CONCLUSÃO

Ehrlichia canis está presente nas duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Além disso, com o estudo, foi possível observar que existem dois genótipos circulando nas duas mesorregiões, o genogrupo americano na mesorregião Sul Fluminense e Metropolitana, além do genogrupo brasileiro na mesorregião Metropolitana.

A anemia foi a alteração hematológica com maior frequência nos animais positivos para *E. canis*.

As variáveis sexo e raça não demonstraram associação com a positividade para *E. canis*, porém cães até 12 meses tiveram associação com a infecção pela riquétisa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M., RODRIGUES, F. P., RIBEIRO, M. G., DOS SANTOS, B., MURARO, L. S., TAQUES, I. I. G. G., ... & TAKAHIRA, R. K. (2020). Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, v. 67, p. 135-141, 2020.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007b.
- AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007a.
- AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; BRAGA, I. A.; TAQUES, I. I.; & MCBRIDE, J. W. Detection of genotype-specific *Ehrlichia canis* exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. **Ticks and tick-borne diseases**, v.7, n. 1, p.142-145, 2016.
- AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; PACHECO, T. A.; MENESES, A. M. C.; ZANUTTO, M. S.; ... & LABRUNA, M. B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 315-32, 2013.
- AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZHANG, X.; MELO, A. L.; BRAGA, I. A.; WITTER, R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, H. S.; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S.; LABRUNA, M. B.; & MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 537–544, 2014.
- AKTAS, M.; ÖZÜBEK, S. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases**. v. 64, p. 20- 24, 2019.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **How cells read the genome: from DNA to protein**. In: Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, p. 329-410, 2008.
- ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. **Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. In: ALMOSNY, N. R. P. (Ed). Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e zoonoses. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda, 135p. cap. 1, p. 13-56, 2002.
- AZEVEDO, S. S. de; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F. de; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. da F.; UCHÔA, I. C. P. Seroprevalence and risk factors associated to *Ehrlichia canis* in dogs from the semiarid of Paraíba State, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.

AZIZ, M. U.; HUSSAIN, S.; SONG, B.; GHOURI, H. N.; ZEB, J.; SPARAGANO, O. A. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. **Veterinary Sciences**. v. 10, n.1, p. 21, 2022.

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

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, pp. 4172-4177, 2003.

BORIN, S.; CRIVELANTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n3, p.566-71, 2009.

BOUZA-MORA, L.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZU, J. J, SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J, SALAZAR-SÁNCHEZ, L., LABRUNA, M. B., AGUIAR, D. M. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 8, p. 36-40, 2016.

BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K. Babesiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, v. 7, p. 50-59, 2002.

BRANDÃO, V. M. D.; BARROZO, P. H. M.; SOUSA, L. O.; SANTOS, R. C. D.; SCHWANKE, K., SAMPAIO, F. D.; PRADO, W. S.; AMARAL, S. C.; CAVALCANTE, G. G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n.12, e20190414, 2019.

CABEZAS-CRUZ, A.; VALDES, J. J.; DE LA FUENTE, J. The glycoprotein TRP36 of *Ehrlichia* sp. UFMG-EV and related cattle pathogen *Ehrlichia* sp. UFMT-BV evolved from a highly variable clade of *E. canis* under adaptive diversifying selection. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 584, 2014.

CÁRDENAS, A. M.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTVET, R. E.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 2, p. 123-128, 2007.

CARLI, E. et al. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Veterinary Parasitology**, v.162, p.51-57, 2009.

CARTAGENA YARCE, L. M.; RÍOS OSORIO, L. A.; CARDONA ARIAS, J. A. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. **Revista Medicina Veterinaria**, n. 29, p. 51-62, 2015.

CICUTTIN, G. L.; DE SALVO, M. N.; DOHMEN, F. E. G. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 5, p. 954-957, 2016.

CICUTTIN, G. L.; TARRAGONA, E. L.; DE SALVO, M. N.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 724-729, 2015.

CORDEIRO, M. D.; GAUDENCIO, F. N.; CHAGAS, J. D. R.; CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; BAETA, B. A. Detecção molecular de *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* e *Babesia* spp. em cães atendidos em clínica da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. *Revista brasileira Ciência Veterinária*, v. 30, n. 1, p. 29-34, jan./mar. 2023.

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

CRUZ, A. C., ZWEYGARTH, E., RIBEIRO, M. F. B., DA SILVEIRA, J. A. G., DE LA FUENTE, J., GRUBHOFFER, L., ... & PASSOS, L. M. F. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. **Parasites & vectors**, v.5, n.1, p.1-12, 2012.

CUSICANQUI, J. S; ZUNIGA, R. F. Frecuencia serológica de *Ehrlichia canis* en caninos sospechosos de ehrlichiosis en los distritos de Lima Norte, Perú. **Revista de investigaciones veterinarias del Perú**, Lima , v. 31, n. 3, e18164, 2020.

DA COSTA, R. L. **Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935) em cães do Estado do Rio de Janeiro**. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 91f, 2018.

DA COSTA, R. L.; PAULINO, P. G.; DA SILVA, C. B.; VITARI, G. L. V.; PEIXOTO, M. P.; DE ABREU, A. P. M.; ... & MASSARD, C. L. (2019). Molecular characterization of *Ehrlichia canis* from naturally infected dogs from the state of Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-12, 2019.

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

DAGNONE, A. S., SOUZA, A. I. D., ANDRÉ, M. R., & MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p. 20-25, 2009.

DAGNONE, A. S.; DE MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191-201, 2001.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

DE TOMMASI, A.S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; TASCA, S.; CANTACESSI, C.; BREITSCHWERDT E.B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; CAPELLI, G.; CAPRARIIS, D. Evaluation of Blood and Bone Marrow in Selected Canine Vector-Borne Diseases. **Parasites & Vectors**, v.7, p. 534, 2014.

DIAS, V. A. C. M.; FERREIRA, F. L. A. Babesiose canina: revisão. **Pubvet**, v. 10, n. 12, p. 886-888, 2016.

DINIZ, P. P. V.; DE AGUIAR, D. M. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1225-1266, 2022.

DOYLE, C. K.; NETHERY, K. A.; POPOV, V. L.; MCBRIDE, J. W. Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. **Infection and immunity**, v. 74, n. 1, p. 711-720, 2006.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; ... & RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

FERREIRA, R. F. **Caracterização e análise da diversidade dos genes codificadores das proteínas GP19 e GP36 de *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935) detectada em sangue total de cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados**. 2012. 106f. Tese (Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2012.

FERREIRA, R. F., CERQUEIRA, A. D. M. F., CASTRO, T. X. D., FERREIRA, E. D. O., NEVES, F. P. G., BARBOSA, A. V., ... & ALMOSNY, N. R. P. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 301-308, 2014.

FERROLHO, J.; ANTUNES, S.; SANCHES, G. S.; COUTO, J.; ÉVORA, P. M.; ROSA, C., ... & DOMINGOS, A. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 174-184, 2017.

FURLANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 77-85, 2005.

GEIGER, J.; MORTON, B. A.; JOSE, E.; VASCONCELOS, R.; TNGRIAN, M.; KACHANI, M.; BARRÓN, E. A.; GAVIDIA, C. M.; GILMAN, R. H.; NOELIA, P.; LERNER, R.; TAMERIN, S.; MIRRASHED, H.; OAKLEY, B.; PAULO, P.; DINIZ, V. P. Molecular characterization of Tandem Repeat Protein 36 gene of *Ehrlichia canis* detected in naturally infected dogs from Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 146, p. 1-13, 2018.

GOUY, M.; TANNIER, E.; COMTE, N.; PARSONS, D. P. Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. **Methods in Molecular Biology**, v. 2231, p. 241-260, 2021.

GUIMARÃES, A. M. et al. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **Clínica Veterinária**, n. 41, p. 60-68, 2002.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary microbiology**, v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

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

HARVEY, J. **Thrombocytotropic Anaplasmosis (*A. platys* [*E. platys*] Infection)**. 229-231 p. IN: GREENE, CE Infectious Diseases of the dog and cat Saunders Elsevier, 3 Ed, St Louis, Elsevier, p. 1387, 2006.

HARVEY, J. W. **Anaplasma platys infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis)**. In: GREENE, C. E. (Ed). Infectious diseases of the Dog and Cat. 4th Ed. Elsevier, Cap. 26, p. 257-259, 2012.

HOLANDA, L. C. D.; ALMEIDA, T. L. A. C. D.; MESQUITA, R. M. D.; OLIVEIRA JÚNIOR, M. B. D.; OLIVEIRA, A. A. D. F. Achados hematológicos em sangue e medula óssea de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, e-47686, 2019.

HONORATO, S. M. **Estudo da infecção natural por *Ehrlichia canis* em cães no Distrito Federal e Entorno**. 2021. 56 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)—Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

HSIEH, Y.-C.; LEE, C.-C.; TSANG, C.-L.; CHUNG, Y.-T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. **Veterinary Microbiology**. 146, p. 70–75, 2010.

IPEK, N. D. S.; ÖZÜBEK, S.; AKTAS, M. Molecular evidence for transstadial transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. **Journal of medical entomology**, v. 55, n. 2, p. 440-444, 2018.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 20–27, 2007.

KAMANI, J. L. E. E. C. C.; HARUNA, A. M.; CHUNG, P. J.; WEKA, P. R.; CHUNG YT. First detection and molecular characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Nigeria. **Research in Veterinary Science**. v. 94, n.1, p. 27-32, 2013.

KASSAB, S. **Identificação molecular de hemoparasitos em cães no município de Rio Branco, Acre**. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Acre, 61p, 2021.

KAZUTAKA, K.; DARON, M.; STANDLEY, M. Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KOICHIRO T.; GLEN S.; SUDHIR K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinic of Small Animals**. v. 40, p. 1121–1140, 2010.

LONG, W.; ZHANG, X.F.; QI, H.; STANDAERT, S.; WALKER, D.; YU, X.J. Antigenic Variation of *Ehrlichia chaffeensis* Resulting from Differential Expression of the 28-Kilodalton Protein Gene Family. **Infection And Immunity**, v.70, n.4, p.1824–1831, 2002.

MACEDO, E. A. **Ultrastructural characteristics of cells parasited by *Ehrlichia* spp., diagnosis methods and histopathological alterations in dog organs with ehrlichiosis from Uberlândia-MG**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

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

MARQUES, D.; GOMES, D. E. Erliquiose Canina. **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1, 2020.

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

McBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441-447, 1996.

McBRIDE, J. W.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; CARDENAS, A. M.; POPOV, V. L.; NETHERY, K. A.; WOODS, M. E. Identification of a glycosylated *Ehrlichia canis* 19-kilodalton major immunoreactive protein with a species-specific serine-rich glycopeptide epitope. **Infection and immunity**, v. 75, n. 1, p. 74-82, 2007.

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

MEDEIROS, M. Â. D. S.; SILVA, M. H. D.; MATTA, M. A. D. V.; FERREIRA, E. D. O.; MACHADO, S. L.; SOARES, J. F.; ... & ALMOSNY, N. R. P. Expression and antigenic analysis of the recombinant TRP36 protein from *Ehrlichia canis* São Paulo strain for serologic tests. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 1-12, 2020.

MENESES, I. D. S.; SOUZA, B. M. P. S.; TEIXEIRA, C. M. M.; GUIMARÃES, J. E. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana da Bahia. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**. v. 9, n. 4, p. 770-6, 2008.

MITTAL, M.; KUNDU, K.; CHAKRAVARTI, S.; MOHAPATRA, J.K.; NEHRA, K.; SINHA, V.K.; SANJEETH, B.S.; CHURAMANI, C.P.; KUMAR, A. Canine Monocytic Ehrlichiosis among working dogs of organised kennels in India: A comprehensive analyses of clinico-pathology, serological and molecular epidemiological approach. **Preventive Veterinary Medicine**, v.1, n.147, p.26-33, 2017.

MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K.; GOLIM, M. A.; BAGGIO, M. S. Avaliação das alterações hemostáticas e do risco tromboembólico em cães com AHIM. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 405-411, 2016.

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

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; ... & FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary microbiology**, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T. et al. Canine ehrlichiosis : clinical , hematological , serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766–770, 2008.

NAMBOOPPHA, B.; RITTIPORNLERTRAK, A.; TATTIYAPONG, M.; TANGTRONGSUP, S.; TIWANANTHAGORN, S.; CHUNG, Y. T.; STHITMATEE, N. Two different genogroups of *Ehrlichia canis* from dogs in Thailand using immunodominant protein genes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 116-125, 2018.

NAVARRETE, M. G., CORDEIRO, M. D., SILVA, C. B., MASSARD, C. L., LÓPEZ, E. R., RODRÍGUEZ, J. C. A., ... & FONSECA, A. H. Serological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* and associated risk factors in dogs domiciled in western Cuba. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 170-175, 2018.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 309-315, 2002.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLERRINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dog from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p.81-85, 2005.

PAULA, W. V. D. F., TAQUES, Í. I. G. G., MIRANDA, V. C., BARRETO, A. L. G., PAULA, L. G. F. D., MARTINS, D. B., ... & KRAWCZAK, F. D. S. Soroprevalência e alterações hematológicas associadas com *Ehrlichia canis* em cães encaminhados a um hospital veterinário-escola no centro-oeste do Brasil. **Ciência Rural**, v.52, 2021.

PAULINO, P. G., PIRES, M. S., DA SILVA, C. B., PECKLE, M., DA COSTA, R. L., VITARI, G. V., ... & SANTOS, H. A. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive veterinary medicine**, 159, 135-142, 2018.

QUEIROZ, Stephanny et al. DETECTION AND LABORATORY FINDINGS DUE TO EHRLICHIA CANIS IN DOGS FROM THE SOUTH AREA OF SÃO PAULO-SP, BRAZIL. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 2, n. 7, p. 1-5, 2022.

RAR, V., GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution**. n. 11, p. 1842–1861, 2011.

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T.; BONES, E. R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; ... & VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 129-136, 2017.

RODRIGUEZ, J. M. Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 3, p. 287-305, 1997.

RODRÍGUEZ-ALARCÓN, C. A.; BERISTAIN-RUIZ, D. M.; OLIVARES-MUÑOZ, A.; QUEZADA-CASASOLA, A.; PÉREZ-CASIO, F.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, J. A.; ... & FIGUEROA-MILLÁN, J. V. Demonstrating the presence of *Ehrlichia canis* DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. **Parasites Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2020.

ROTONDANO, T. E. D. F.; KRAWCZAK, F. D. S.; BARBOSA, W. D. O.; MORAES-FILHO, J.; BASTOS, F. N.; LABRUNA, M. B.; ... & ALMEIDA, A. M. P. D. *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 211-215, 2017.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ... & MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SCHETTERS, T. P.; KLEUSKENS, J. A. G. M.; VAN DE CROMMERT, J.; DE LEEUW, P. W. J.; FINIZIO, A. L.; GORENFLOT, A. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. **Veterinary parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 7-15, 2009.

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

SILVA, G. C. F. D.; BENITEZ, A. D. N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; ... & VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, p. 379-385, 2012.

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

SOUSA, V.R.F.; ALMEIDA, A.B.P.F.; BARROS, L.A.; SALES, K.G.; JUSTINO, C.H.S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T.C.B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v.40, p.1309-1313, 2010.

SOUZA, B. M. P. D. S.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C. P. M.; UZÊDA, R. S.; ALCÂNTARA, A. C. D.; FERREIRA, F.; ... & FRANKE, C. R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 19, p. 89-93, 2010.

TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n.7, p. 3022–3027, 2021.

TAQUES, I. I. G. G., CAMPOS, A. N. S., KAVASAKI, M. L., DE ALMEIDA, S. L. H., & DE AGUIAR, D. M. Geographic distribution of *Ehrlichia canis* TRP genotypes in Brazil. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2020.

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

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOD, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUMA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

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

WANER T.; HARRUS S.; BARK H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 69, p.307-317, 1997.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; JORGE MENDONÇA, AFONSO.; MOURA DE AGUIAR, DANIEL. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, MT. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n. 6, p. 3811-22, 2013.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 75-98, 1991.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench" **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

XAVIER, M. **Estudos de Hemoparasitos por evidências morfológicas, sorológicas e moleculares, com ênfase na família Anaplasmataceae em *Canis familiaris* L., na região litorânea do Estado do Rio de Janeiro**. 2011. 222 f. Tese (Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15, n.7, p.1080-1088, 2008.

ZWEYGARTH, E.; CABEZAS-CRUZ, A.; JOSEMANS, A. I.; OOSTHUIZEN, M.C.; MATJILA, P. T.; LIS, K.; BRONISZEWSKA, M.; SCHÖL, H.; FERROLHO, J.; GRUBHOFFER, L.; PASSOS, L. M. F. In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. **Ticks and Tick-Borne Diseases** 5, p. 423–431, 2014.

ANEXOS

I- Parecer do CEUA/UFRRJ autorizando a realização da pesquisa.



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diagnóstico e isolamento de hemoparasitos de cães de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro", protocolada sob o CEUA nº 7340040222 (ID 002182), sob a responsabilidade de **Bruna de Azevedo Baêta e equipe; Adivaldo Henrique da Fonseca; Matheus Dias Cordeiro ; Diogo dos Santos Maia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 07/02/2022.

We certify that the proposal "Diagnosis and isolation of hemoparasites in dogs f.r.o.m two mesoregions of the state of Rio de Janeiro", utilizing 200 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7340040222 (ID 002182), under the responsibility of **Bruna de Azevedo Baêta and team; Adivaldo Henrique da Fonseca; Matheus Dias Cordeiro ; Diogo dos Santos Maia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 02/07/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **de 03/2022 a 01/2025**

Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 180 meses**

N: **200**

Linagem: **diferentes raças**

Peso: **3 a 40 kg**

Local do experimento: O local de exame dos animais será de acordo com a preferência dos tutores, podendo ser realizado na residência ou na clínica veterinária onde o animal estiver sendo atendido.

Seropédica, 08 de fevereiro de 2022

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado aos responsáveis pelos animais



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Diagnóstico e isolamento de hemoparasitos de cães de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro

Razão Social / CEUA: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – CEUA IV

CIAEP: 02.0081.2019

Equipe Executora

Nome	Telefone	E-mail	Função
Bruna de Azevedo Baêta	(21)994736838	babaeta@ufrrj.br	Docente/coordenadora
Adivaldo Henrique da Fonseca	(21)987108868	adivaldo@ufrrj.br	Pesquisador/colaborador
Matheus Dias Cordeiro	(21)986191846	mathcordeiro@hotmail.com	Técnico/Executante
Diogo dos Santos Maia	(21) 99599-3541	dm_patoclin@gmail.com	Mestrando/Executante
Jônathan David Ribas Chagas	(24) 99307-0289	jonatachagas@hotmail.com	Mestrando/Executante

Telefone CEUA/IV/UFRRJ: (21) 2682-3051

Prezado Sr. (Sra.),

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu animal em projeto de pesquisa, que tem como finalidade diagnosticar cães portadores de *Anaplasma* sp, *Ehrlichia* sp e *Rickettsia* sp de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, através de análises hematológicas e moleculares, e proceder o isolamento e propagação in vitro destes patógeno, utilizando cultivo de células de carrapatos.

Os cães serão inspecionados quanto a presença de carrapatos e então será realizada as coletas de carrapatos e de amostra sanguínea desses animais. Após avaliação clínica será realizada coleta de 3mL de sangue por punção da veia cefálica ou jugular. Ao retirar a agulha 23G haverá compressão do local com algodão até coagulação. Animais agressivos serão contidos durante todo o exame clínico com atadura de algodão no focinho apropriada para o seu porte/tamanho. O procedimento não oferece riscos para saúde do animal. Após as análises, os tutores serão informados sobre resultados dos exames dos animais e com os resultados da pesquisa, aumentará o conhecimento sobre os hemoparasitos de cães, podendo servir para futuros estudos de diagnóstico e produção de material diagnóstico.

Todos os procedimentos seguem os princípios éticos no uso de animais elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado



pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob o CEUA N° _____.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) _____, inscrito(a) no CRMV sob o n° _____. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Bruna de Azevedo Baêta, também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele.

Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos descritos no início deste documento.

Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Identificação dos animais			
Nome ou número	Espécie	Raça	Idade

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

(local). _____ de _____ de _____

B. Baêta

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador