

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

**DISSERTAÇÃO**

**Detecção molecular de *Ehrlichia canis* (Donatien, Lestoquard, 1937) no seu hospedeiro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (Latreille, 1806) coletados em municípios com diferentes altitudes no sudeste do Estado do Rio de Janeiro**

**Leo Paulis Mendonça**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *EHRlichia canis* (DONATIEN,  
LESTOQUARD, 1937) NO SEU HOSPEDEIRO *RHIPICEPHALUS*  
*SANGUINEUS* (ACARI: IXODIDAE) (LATREILLE, 1806) COLETADOS  
EM MUNICÍPIOS COM DIFERENTES ALTITUDES NO SUDESTE DO  
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**LEO PAULIS MENDONÇA**

*Sob a orientação do professor*

**Carlos Luiz Massard**

*e co-orientação do professor*

**Huarrisson Azevedo Santos**

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

Seropédica, RJ

Março de 2020

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

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

MM539d Mendonça, Leo Paulis, 1991-  
Detecção molecular de Ehrlichia canis (Donatien, Lestoquard, 1937) no seu hospedeiro Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) (Latreille, 1806) coletados em municípios com diferentes altitudes no sudeste do Estado do Rio de Janeiro / Leo Paulis Mendonça. - Rio de Janeiro, 2020.  
62 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.  
Coorientador: Huarrisson Azevedo Santos.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2020.

1. Parasitologia Veterinária. 2. Biologia molecular. 3. Epidemiologia. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-, orient. II. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

LEO PAULIS MENDONÇA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 05/03/2020



Carlos Luiz Massard, Dr., UFRRJ

(Orientador)



Cláudia Bezerra da Silva, Ph.D., UFRRJ



Erica Cristina Rocha Roier, Dra., Universidade de Vassouras



Maristela Peckle Peixoto, Ph.D., UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta obra ao meu pai, Luis Antonio, que sempre me apoiou e a quem devo todo meu sucesso; ao meu irmão, Lucas, pelo exemplo que é, e pelo apoio emocional; ao meu filho, Theodoro, minha maior riqueza e razão para nunca desistir; aos professores e colegas que tanto me ensinaram e estiveram presentes e disponíveis ao longo desse trabalho; aos amigos que acompanharam minha trajetória, sempre generosos, incentivando meu progresso.*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor incondicional, educação e por incentivar minha formação acadêmica;

Ao meu orientador Carlos Luiz Massard pelos ensinamentos e sabedoria passada;

Ao meu co-orientador Huarrisson Azevedo Santos pela oportunidade, pela confiança que sempre depositou em mim, pela disponibilidade e por todo o conhecimento que transmite a mim e à todos colegas;

À equipe do LASAVE e do LHV, principalmente à Débora Martins dos Santos, Tays Araújo Camilo e Josemar Gonçalves, nossa equipe de campo, que me proporcionaram um grande crescimento profissional; À Professora Maristela Peckle, pela confiança e pelos ensinamentos acerca da parasitologia; À Patrícia Gonzaga Paulino e à Nathália Senne, pela boa vontade e disposição no laboratório e para elaboração desse documento;

Aos amigos que estiveram presentes na minha vida durante essa caminhada,

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

Muito obrigado!

## RESUMO

MENDONÇA, Leo Paulis, “**Deteção molecular de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) no seu hópedeiro invertebrado *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) coletados em municípios com diferentes altitudes no sudeste do Estado do Rio de Janeiro**”. 2020, 54 p. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Os carrapatos são vetores de doenças com grande importância para saúde humana e animal. Os carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), conhecidos como “carrapato comum do cão”, estão sob investigação que visa determinar sua posição taxonômica, e mais recentemente através de técnicas moleculares foi determinado que existem duas linhagens com diferenças significativas, sendo o clima em que vivem a principal delas, sendo assim nomeadas de temperada ou tropical. A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma rickettsiose transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* da linhagem tropical, causada pelo agente intramonocítico *Ehrlichia canis* e possui grande importância para a saúde dos cães e um recente caráter zoonótico ainda em investigação, sendo diagnosticada com relativa frequência em estabelecimentos veterinários. O presente estudo trata de uma investigação epidemiológica, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção do agente em questão em amostras de órgãos de carrapatos coletados em diferentes altitudes no sudeste do Estado do Rio de Janeiro. Foram realizadas saídas mensais aos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis, visitando residências por conveniência não-probabilística nas áreas urbana e rural de cada município e selecionados proprietários de cães pela vontade de participar do estudo, que responderam um questionário epidemiológico contendo informações sobre os animais e o ambiente na ocasião. Para a coleta dos carrapatos, foi realizada uma busca por 15 minutos tanto no animal quanto no ambiente, e os espécimes capturados foram colocados em tubos de ensaio tampados com algodão e levados ao laboratório, onde foram lavados, identificados, acondicionados em B.O.D. e dissecados no dia seguinte com o auxílio de uma lupa. Os órgãos obtidos de cada carrapato foram acondicionados separadamente em conservante RNAlater® em microtubos de 1,5 ml à -20 °C até a extração do material genético. Ao todo foram coletados 412 carrapatos, dentre os quais 86 fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* que foram dissecadas. A detecção do agente através da qPCR revelou positividade de 15 entre 86 carrapatos dissecados (17,71%), e dentre os órgãos, 15 entre 86 amostras de intestino e glândula salivar foram consideradas positivas (17,71%), enquanto apenas 10 entre 86 amostras de ovários foram consideradas positivas (11,62%). Variáveis intrínsecas aos animais não apresentaram influência significativa na infecção de seus carrapatos por *E. canis*. Os carrapatos na estação seca apresentaram 3,97 vezes mais chances de estarem infectados por *E. canis* que na estação chuvosa (IC: 0,89 – 17,71,  $p < 0,05$ ). Carrapatos coletados em altitudes superiores a 650 m apresentaram 2,86 vezes mais chances de estarem infectados por *E. canis* que carrapatos coletados em altitudes abaixo de 650 m (IC: 0,9 – 9,15,  $p = 0,05$ ). A linhagem dos carrapatos envolvidos na transmissão de *E. canis* nas condições do presente estudo foi constatada como tropical através de digestão por enzimas de restrição de um produto amplificado do DNA mitocondrial que transcreve para a subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA).

**Palavras-chave:** carrapato, cães, erliquiose monocítica canina.

## ABSTRACT

MENDONÇA, Leo Paulis, “**Molecular detection of *Ehrlichia canis* (Donatien, Lestoquard, 1935) in its invertebrate host *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (Latreille, 1806) collected in municipalities with different altitudes in the southeastern state of Rio de Janeiro**”. 2020. 54 p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Ticks are vectors of diseases of great importance for human and veterinary health. The ticks of the group *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), known as "common dog tick", are under investigation for their exact taxonomic position, and more recently using molecular techniques it was determined that there are two different lineages, each one adapted to the climate in which they live, temperate or tropical. Monocytic Canine Ehrlichiosis (EMC) is a disease transmitted by ticks *Rhipicephalus sanguineus* of tropical lineage, caused by the intramonocytic agent *Ehrlichia canis* and has great importance for the health of dogs and a new zoonotic profile still under investigation, being diagnosed very often in veterinary establishments. The present study deals with an epidemiological investigation, using a real-time PCR technique (qPCR) to detect the agent in question in tick organs samples collected at different altitudes in the State of Rio de Janeiro. Monthly surveys were made to the municipalities of Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis and Teresópolis, visiting residences by non-probabilistic convenience sampling in the urban and rural areas of each municipality and selected for dogs, after being allowed to participate in studies, who answered an epidemiological questionnaire using information about animals and the environment at the time. Ticks were searched for 15 minutes in animals and in the environment for the same amount of time, put in test tubes capped with cotton, identified, conditioned in B.O.D. chamber and dissected the next day. The organs of each tick were stored in preservative RNAlater® in 1.5 ml microtubes at -20 ° C until the extraction of the genetic material. In all, 412 ticks were collected, among which 86 engorged females of *R. sanguineus* were dissected. Detection of the agent using qPCR revealed a positivity of 15 out of 86 dissected ticks (17.71%), and among the organs, 15 out of 86 cuts of the intestine and salivary gland were positive (17.71%), while only 10 among 86 ovary samples were positive (11.62%). Variables intrinsic to animals were did not influence in the infection of their ticks by *E. canis*. Ticks in the dry season were 3.97 times more likely to be infected with *E. canis* than in the rainy season (CI: 0.89 - 17.71,  $p < 0.05$ ). Ticks collected at altitudes above 650 m. were 2.86 times more likely to be infected by *E. canis* than ticks collected at altitudes below 650 m (CI: 0.9 - 9.15,  $p = 0.05$ ). The strain of ticks involved in the transmission of *E. canis* under the conditions of the present study was found to be tropical through digestion by restriction enzymes of an amplified product of mitochondrial DNA that transcribes into the 16S subunit of the ribosomal RNA (16S rRNA).

Key-words: ticks, dogs, monocytic canine ehrlichiosis



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Inclusão no citoplasma de um monócito. A seta indica a divisão aparente de um corpo elementar. Fonte: HILDEBRANT et al., 1973.	9
<b>Figura 2</b>	Fotografias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l obtidas a partir de estereoscópio (utilizando lupa 10X, aumento de 3,5x). 1- Face ventral de fêmea; 2- Face ventral de macho; 3- Face dorsal de fêmea; 4- Face dorsal de macho. Fonte: arquivo pessoal.	11
<b>Figura 3</b>	Fêmeas de <i>R. sanguineus</i> realizando postura em uma fresta entre a casa de madeira do cão e uma pedra de apoio. Fonte: arquivo pessoal.	12
<b>Figura 4</b>	Todos os estágios de uma fêmea de <i>R. sanguineus</i> : 1- quenógina realizando postura de ovos; 2- larva (seta), 3- larva ingurgitada; 4- ninfa; 5- ninfa ingurgitada; 6 e 7- Fêmeas ingurgitadas. Fonte: arquivo pessoal.	14
<b>Figura 5</b>	A- Carrapatos adulto no dorso de um cão; B e C- Ninfas ingurgitadas na orelha de um cão. Fonte: arquivo pessoal.	16
<b>Figura 6</b>	Mapa do estado do Rio de Janeiro, com distinção de regiões administrativas. Fonte: MAPAS PARA COLORIR (2019).	22
<b>Figura 7</b>	As altitudes de cada município estudado variam da seguinte maneira, aproximadamente: Paracambi: 0 – 450 m; Barra do Piraí: 300 – 750 m; Petrópolis: 650 – 1050 m; Teresópolis: 750 – 1050 m. Fonte: < <a href="http://pt-br.topographic-map.com/places/Rio-de-Janeiro-7883764">http://pt-br.topographic-map.com/places/Rio-de-Janeiro-7883764</a> >.	23
<b>Figura 8</b>	Fotos da dissecação de uma fêmea de <i>R. sanguineus</i> . 1- pique inicial; 2- fixação do alfinete entomológico; 3- corte na cutícula nas laterais; 4- órgãos internos de uma fêmea de carrapato.	25
<b>Figura 9</b>	Organograma representando os espécimes coletados por estágio e município.	31
<b>Figura 10</b>	Padrão de digestão da enzima <i>Vsp I</i> . A digestão segundo a literatura (Paiva, 2019) produziria fragmentos de 194, 153 e 93 pares de base, podendo ser observado esse padrão no gel acima. O marcador de peso molecular mostrado à esquerda foi inserido no primeiro poço começando pelo lado da esquerda do gel. Em seguida, vinte amostras do produto amplificado de DNA extraído de intestino de carrapatos. A vigésima primeira amostra é um controle positivo de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , sabidamente linhagem tropical através de sequenciamento. O vigésimo segundo poço é uma amostra de DNA de <i>Amblyomma romarioi</i> . A vigésima terceira é o controle positivo sem passar pela digestão, e finalmente, no último poço, novamente o Ladder.	32
<b>Figura 11</b>	Gráfico: Carrapatos de todas as fases e espécies encontrados em cada município por estação.	34
<b>Figura 12</b>	Gráfico de positividade para as fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> dissecadas. A altura de cada barra indica o número de espécimes para cada classe do eixo x, separadas por municipalidade e zona. Barras pretas representam espécimes positivos e barras cinza espécimes negativos para	

	qPCR com alvo no gene 16S rDNA de <i>Ehrlichia canis</i> .	35
--	--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Histórico.....	4
2.2 Agente.....	5
2.3 Vetor.....	6
2.4 Ciclo de vida.....	9
2.4.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	9
2.4.2 <i>Ehrlichia canis</i> .....	11
2.5 Transmissão.....	11
2.6 Fatores de risco.....	13
2.6.1 Intrínsecos.....	13
2.6.2 Extrínsecos.....	14
2.7 Altitude.....	14
2.8. Sinais Clínicos.....	15
2.9 Diagnóstico.....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Descrição da área de estudo.....	18
3.2 Coletas de carrapatos em diferentes altitudes.....	19
3.3 Questionário epidemiológico.....	20
3.4 Identificação Morfológica.....	21
3.5 Processamento e armazenamento de ectoparasitas.....	21
3.6 Extração de DNA.....	23
3.7 PCR em tempo real.....	23
3.8 Genotipagem das linhagens dos espécimes de <i>R. sanguineus</i> .....	24
3.8.1 PCR convencional para o gene 16S rRNA.....	24
3.8.2 Avaliação do produto amplificado.....	24
3.8.3 Padrão de fragmentos de digestão enzimática (RFLP).....	25
3.9 Análise Bivariada.....	26
3.10 CEUA.....	27
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>

4.1 Carrapatos coletados.....	28
4.2 Detecção molecular de <i>E. canis</i> através de qPCR de amostras de órgão de carrapatos com alvo no gene 16S.....	28
4.3 Identificação da linhagem de <i>R. sanguineus</i> por RFLP – PCR com alvo no gene mitocondrial 16S rRNA.....	29
4.4 Análise bivariada.....	30
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b>	
Questionário epidemiológico e termo de consentimento livre e esclarecido.....	48
Protocolo de extração Qiagen® Dneasy Blood and Tissue Extraction Kit.....	54

# 1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores são responsáveis por 700.000 mortes no mundo todos os anos. Os carrapatos transmitem muitas dessas doenças, sendo ultrapassados apenas pelos mosquitos, portanto, tem grande importância para a saúde pública (OIE, 2017). Os médicos e médicos veterinários são os profissionais que se dedicam a estudar os aspectos clínicos, biológicos, vetoriais e epidemiológicos dessas doenças, auxiliando em novas estratégias de combate através do estabelecimento de programas multidisciplinares de estudo, monitoramento e controle das doenças transmitidas por vetores (BARKER; REISEN, 2019).

Nos últimos anos, estão sendo observados surtos dessas doenças em escala global. O aparecimento ou reemergência das doenças transmitidas por vetores está relacionada à ação antropogênica, pela ocupação de novas áreas, modificação do espaço físico, interferência climática e nas relações biológicas, aumentando a distribuição dos vetores ou pela evolução dos parasitas para formas mais virulentas e a aquisição de resistência aos fármacos (BRASIL, 2017).

A investigação dos processos que levam ao aumento das doenças se apoia em conceitos básicos, porém são vastas as formas de abordagem utilizadas nos estudos. Para se relacionar um vetor à transmissão de uma doença deve ser realizado um trabalho de campo e observada a sua distribuição no espaço e no tempo, a seleção de seus hospedeiros, o grau de infestação natural e sua capacidade vetorial. Estudos mais aprofundados em laboratório permitem o maior entendimento do ciclo do patógeno, mecanismos de amplificação e persistência deste em períodos desfavoráveis (HILL et al, 2005).

Os cães possuem uma estreita proximidade com o homem há pelo menos 10.000 anos. Ectoparasitas adquiridos no ambiente pelo animal trazem dor e incômodo, desencadeiam processos alérgicos e infecciosos na pele e causam anemia pela perda de sangue. Porém, o maior prejuízo reside na transmissão de parasitas patogênicos pelos carrapatos. Os ectoparasitas ganham acesso ao ambiente doméstico através do cão e colocam em risco também a saúde humana (DANTAS-TORRES, 2010).

O chamado “mercado pet” no Brasil movimentou 34,4 bilhões de reais em 2018 e estimou-se um aumento para 36,2 bilhões no ano passado, ocupando a segunda posição no ranking mundial para o faturamento neste setor. Segundo dados de pesquisa, existem 54,2 milhões de cães domiciliados no nosso país. (INSTITUTO PET BRASIL, 2019). Pelo fato de

não serem comercializadas vacinas contra as doenças transmitidas pelos carrapatos, a principal forma de prevenção é o combate ao vetor que é realizado principalmente de duas formas: pelo uso de substâncias carrapaticidas na propriedade em casos de infestação e pela administração de fármacos aos animais que previnem a transmissão dos agentes através da morte rápida do vetor após a picada (HALOS et al, 2012). O número de casos de doenças transmitidas por carrapato vem crescendo devido à abundância do vetor e à falta de adoção de medidas profiláticas eficazes, sendo diagnosticadas diariamente nos consultórios e clínicas de todo o país, gerando despesa com tratamento, exames complementares e suporte veterinário (SILVEIRA et. al., 2009).

Dentre as doenças transmitidas por carrapatos destaca-se a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), que é frequentemente diagnosticada na rotina veterinária. É uma doença causada pela bactéria gram-negativa *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1937) da ordem Rickettsiales, um hemoparasita intracelular obrigatório que acomete principalmente os canídeos, se multiplicando em monócitos e macrófagos e tem como vetor e reservatório natural o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), também conhecido como carrapato marrom do cão. A EMC possui distribuição mundial, e se concentra nas regiões geográficas que apresentam condições favoráveis à multiplicação de seu vetor (ALMOSNY, 2002). Os sinais clínicos da doença apresentam grande variedade entre indivíduos infectados e ao longo de seu curso. Frequentemente são observados: febre, prostração, diarreia, anorexia, epistaxe, linfadenomegalia, petéquias, equimoses, uveíte, poliartrite e até mesmo sinais neurológicos. (ANDEREG e PASSOS, 1999).

O patógeno se multiplica no intestino médio e nas glândulas salivares do carrapato, na transmissão intraestadial, que ocorre quando o vetor adquire *E. canis* através da alimentação no hospedeiro vertebrado, amplificando a bactéria nos seus tecidos e transmitindo para outro cão no mesmo estágio, e com a transmissão transestadial, quando a larva ou ninfa ingere o sangue de um animal infectado, realiza a muda e então transmite o patógeno para outro cão. A transmissão transovariana consiste na passagem do patógeno do vetor para a sua progênie, sendo esta capaz de infectar hospedeiros, ainda não foi observada em *E. canis* no seu vetor (AGUIAR et al., 2007).

Por serem importantes vetores de doenças de animais e humanos, os carrapatos são objeto de estudo de várias pesquisas nas últimas décadas, tanto para a detecção de patógenos em exemplares capturados à campo, como para estudos de aspectos biológicos em colônias

mantidas em laboratório. A vigilância de doenças transmitidas por artrópodes inclui o monitoramento das espécies de carrapatos presentes no ambiente bem como a detecção dos patógenos albergados por esses carrapatos. A prevalência de *E. canis* no carrapato *R. sanguineus* apresenta variações quando os estudos são comparados. Foi encontrada uma taxa de 21% de infecção em carrapatos na República de Camarões (NDIP et al., 2007), 10,4% em Israel (HARRUS et al., 2011) e 23,7 % na Nigéria (KAMANI et al., 2013). No Brasil, essas taxas foram de 21,9% no Nordeste (SOUZA et al., 2010), 4,76% no Mato Grosso (COSTA, 2016) e entre 2,4% e 6,2% em São Paulo (AGUIAR et al., 2007). Em um estudo mais recente foi realizada a detecção molecular do agente em 72 coleções de órgãos dos carrapatos separados por hospedeiro, encontrando uma taxa de infecção de 31%, 10% e 15,2% nos intestinos, ovários e glândulas salivares, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2019). Esse último estudo sugere a possibilidade de transmissão transovariana de *E. canis* no seu vetor.

Devido à necessidade do melhor entendimento dos mecanismos de infecção e transmissão de *E. canis* tanto nos cães como nos carrapatos, o presente documento se trata de um estudo observacional sobre a ocorrência natural de carrapatos em cães domiciliados e no ambiente onde vivem, e a frequência do patógeno *E. canis* nos tecidos dos carrapatos capturados em diferentes altitudes no sudeste do Estado do Rio de Janeiro, utilizando técnicas moleculares e ferramentas epidemiológicas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico da EMC

O agente etiológico *Ehrlichia canis* foi descoberto por Donatien e Lestoquard em 1935 na Argélia. Contudo, a doença só ganhou destaque mais tarde, em 1970, ao causar um grande número de óbitos em cães do exército americano no Vietnã. Nessa ocasião, os veterinários do exército americano nomearam a doença de “Pancitopenia tropical canina”, que foi observada também em cães que nunca haviam saído dos Estados Unidos (NEEL, 1973).

Uma das características marcantes da infecção por *E. canis* é a presença de mórulas em monócitos e macrófagos. Em 1971, Ewing et al. descreveram uma nova cepa que foi encontrada em granulócitos (principalmente neutrófilos) de um cão que apresentava sinais mais brandos que a EMC. Este organismo foi posteriormente referido como o agente etiológico da Erliquiose Granulocítica Canina (EGC) (STOCKHAM et al., 1985), que vem sendo apontado como causador de doença em cães e humanos (MAFRA et al, 2009).

Em 1986 foi observado pela primeira vez nos Estados Unidos inclusões em neutrófilos, linfócitos e monócitos de um homem que havia sido picado por carrapato e adoeceu logo depois. O agente apontado no caso foi “*Ehrlichia canis* ou alguma riquetsia com um alto grau de parentesco”. Na época, apenas uma espécie de *Ehrlichia* spp era reconhecida por infectar humanos (*Ehrlichia sennetsu*, hoje em dia *Neorickettsia sennetsu*) e havia sido encontrada somente no Japão e na Malásia (MMWR, 1988). Hoje em dia, o agente apontado como causador da Erliquiose Monocítica Humana é *Ehrlichia chaffeensis* (GANGULY; MUKHOPADHAYAY, 2008).

A doença causada por *E. canis* é referida como erliquiose. No entanto, também já foi conhecida por uma variedade de sinônimos incluindo pancitopenia tropical canina, tifo canino, febre hemorrágica canina, síndrome idiopática hemorrágica, Distúrbio hemorrágico de Nairobi, riquetsiose canina e doença do cão farejador (WOODY e HOSKINS, 1991).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em Belo Horizonte - MG, por Costa et al. (1973), que identificaram inclusões em linfócitos de um cão infestado naturalmente por *R. sanguineus*. Hoje, a doença é encontrada em todo o território nacional e considerada endêmica em várias regiões do país (AGUIAR et. al., 2007).



Antigamente, acreditava-se que o gênero *Ehrlichia* sp. era espécie-específico, de forma que cada espécie se reproduzisse somente em uma espécie de hospedeiro. Com o avanço das técnicas de diagnóstico (isolamento em meio de cultura, sorologia, *western-blotting*, PCR) para a detecção e caracterização de patógenos, descobriu-se que as espécies de *Ehrlichia* spp. infectam outras espécies de hospedeiros, nem sempre produzindo doença, criando reservatórios para o patógeno (STOCKHAM et al., 1990; BREITSCHWERDT; et. al., 1998).

## 2.2 Agente etiológico

Domínio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Classe: Alphaproteobacteria

Ordem: Rickettsiales

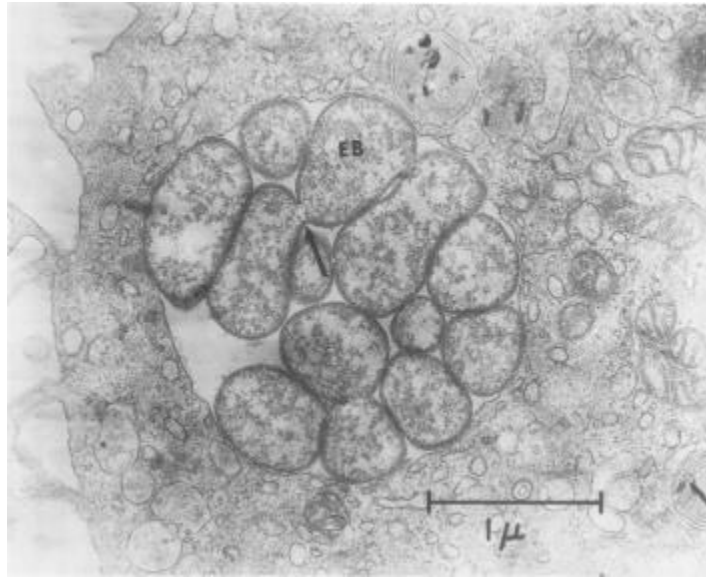
Família: Anaplasmataceae

Gênero: *Ehrlichia*

Espécie: *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquad, 1935)

(Fonte: LPSN)

*Ehrlichia canis* é uma bactéria gram-negativa altamente pleomórfica, envolta por uma fina membrana externa ondulada. As inclusões vistas em microscopia (Figura 1), chamadas de mórulas, consistem em vacúolos delineados por uma membrana contendo corpos elementares agrupados que variam em número e tamanho (HILDEBRANDT et al., 1973 RIKIHISA et al., 1997; RIKIHISA; PERRY; CORDES 1985). A *Ehrlichia canis* mede 0,2-0,4 µm de diâmetro (SILVA, 2001), sendo considerado um microrganismo pequeno, possui a forma de cocobacilos e multiplica-se por divisão binária. Contém um único cromossomo circular contendo 1.315.030 nucleotídeos (MAVROMATIS et al., 2006).



**Figura 1:** Inclusão no citoplasma de um monócito. A seta indica a divisão aparente de um corpo elementar (EB). Fonte: HILDEBRANT et al., 1973.

### 2.3 Vetor

Reino: Metazoa

Filo: Arthropoda

Subfilo: Chelicerata

Classe: Arachnida

Subclasse: Acari

Ordem: Parasitiformes

Subordem: Ixodida

Superfamília: Ixodoidea

Família: Ixodidae

Subfamília: Rhipicephalinae

Gênero: *Rhipicephalus*

Grupo: *R. sanguineus* s.l.

(Fonte: NAVA et. al., 2015)

*Rhipicephalus sanguineus* foi descrito pela primeira vez em 1806 por Latreille, como *Ixodes sanguineus*. Pouco se sabe sobre a origem da espécie *R. sanguineus*. O gênero *Rhipicephalus* é tipicamente africano. Por esse motivo, a hipótese de que *R. sanguineus* é uma

espécie africana que se espalhou em todo o mundo através de cães é a mais amplamente aceita (HARRUS e WANER, 2011).

A classificação específica taxonômica de *R. sanguineus* é um debate em andamento. Diferentes abordagens (por exemplo, morfologia tradicional versus biologia molecular) classificam *R. sanguineus* como um grupo de espécies; isto é, um complexo de cerca de 10 espécies intimamente relacionadas. No entanto, a posição taxonômica exata de espécies pertencentes ao grupo *R. sanguineus* é difícil de determinar por análise morfológica, e métodos fenotípicos não são suficientes para distinguir todos os membros pertencentes a este grupo (DANTAS-TORRES, 2008). Na última década procurou-se classificar populações desse grupo por análises genéticas, e diversos estudos sugeriram a existência de duas linhagens que se distinguem pelo clima onde habitam, denominadas tropical e temperada (SZABO, 2005).

Os membros do grupo *R. sanguineus* podem apresentar diferentes graus de susceptibilidade à infecção por patógenos. Um exemplo disso é a diferença na mortalidade entre as linhagens de carrapatos quando infectados experimentalmente com *Rickettsia conorii* (MATSUMOTO et al., 2005, LEVIN et. al., 2009). Se tratando de *E. canis*, o estudo de Moraes-Filho de 2013 demonstra que a linhagem tropical é um vetor competente desse patógeno, enquanto a linhagem temperada é um vetor incompetente.

Morfologicamente, os carrapatos *R. sanguineus* são pequenos e tem um formato corporal alongado. Eles não possuem ornamentação e tem palpos curtos. Os machos possuem um par de placas adanais que podem ser observadas na face ventral do idiossoma. Nas fêmeas, essas estruturas são ausentes. Possuem também um escudo dorsal que recobre toda sua superfície, ao passo que as fêmeas possuem escudo porém bem menor, permitindo que aumentem bastante de tamanho ao se ingurgitarem. A coxa I é bífida e suas placas espiraculares lembrar o formato de uma vírgula. Uma característica marcante desse gênero é o formato hexagonal da base do capítulo (Figura 2) (BARROS-BATTESTI et.al., 2006).



**Figura 2:** Fotografias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. obtidas a partir de estereoscópio (utilizando lupa 10X, aumento de 3,5x).1- Face ventral de fêmea; 2- Face ventral de macho; 3- Face dorsal de fêmea; 4- Face dorsal de macho. Fonte: arquivo pessoal.

## 2.4 Ciclo de vida

### 2.4.1 *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

O carrapato marrom do cão apresenta ciclo trioxeno, já que cada estágio ativo (larva, ninfa e adulto) se alimenta uma vez e deixa o hospedeiro para digerir o sangue e realizar a muda para o próximo estágio ou realizar a postura. A cópula dos carrapatos ocorre no hospedeiro após a fêmea prender-se no mesmo. Uma fêmea adulta se alimenta no cão por aproximadamente uma semana, até cair e procurar um lugar seguro para incubar os ovos por cerca de uma ou até duas semanas. Rachaduras e frestas no piso e nas paredes das dependências domésticas são frequentes locais de eleição (Figura 3). A postura pode durar de 15 a 18 dias e se inicia normalmente após o quarto dia do fim do ingurgitamento (DANTAS-TORRES, 2010).



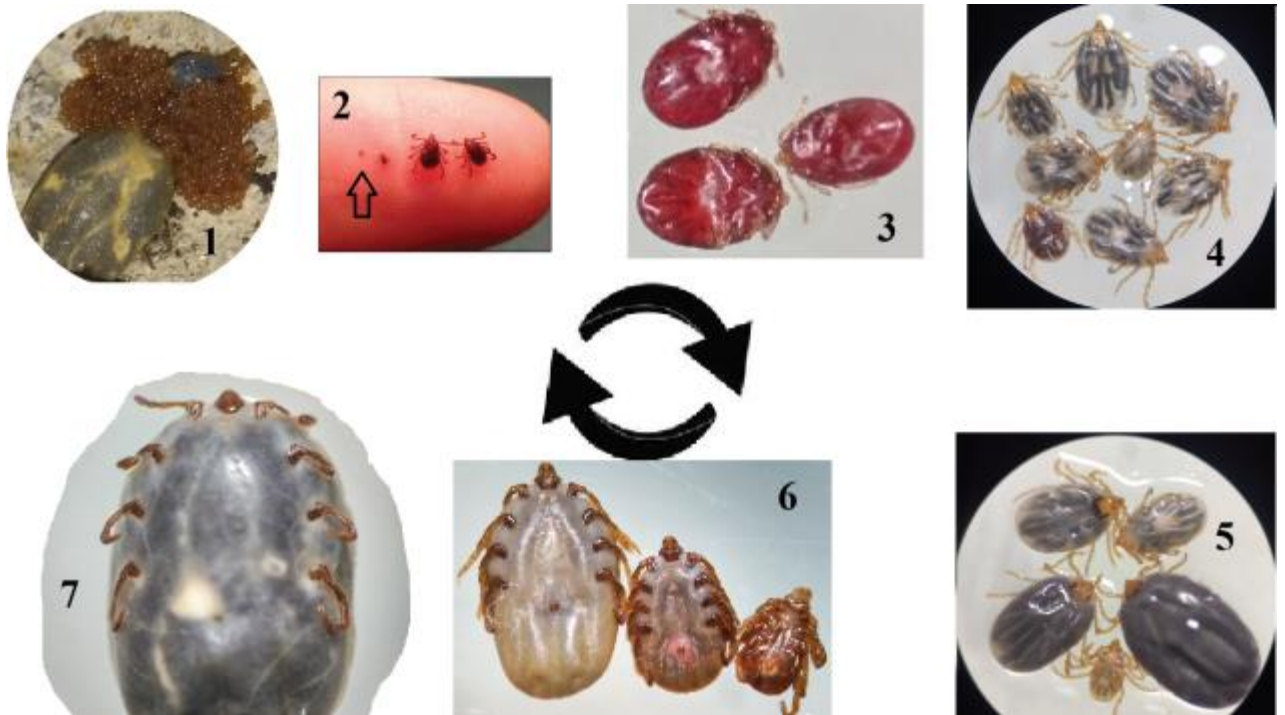
**Figura 3:** Fêmeas de *R. sanguineus* realizando postura em uma fresta entre a casa de madeira do cão e uma pedra de apoio. Fonte: arquivo pessoal.

Uma fêmea ingurgitada pode colocar até 7000 ovos, colocando de 1500 a 4000 ovos ininterruptamente. O número de ovos depende do tamanho do espécime e da quantidade de sangue ingerida. As larvas eclodem de 6 a 23 dias depois e logo procuram por um hospedeiro. Ao subir em um cão, as larvas se prendem e se alimentam de cinco a quinze dias, depois desprendem e passam entre uma e duas semanas até mudarem de estágio para ninfa. Por sua vez, as ninfas procuram um hospedeiro (possivelmente o mesmo animal), se alimentam de três a treze dias, desprendem do animal e levam até duas semanas para mudarem para o estágio adulto (Figura 4). Tanto fêmeas quanto machos se alimentarão de sangue em um hospedeiro, porém os machos se alimentam por períodos mais curtos e podem mudar de hospedeiro a procura de novas parceiras, especialmente em ambientes habitados por mais de um animal (KOCH, 1982).

O período de tempo que cada estágio se alimenta, e o tempo necessário para o desenvolvimento e a muda são dependentes da temperatura local. Esses processos ocorrem mais rapidamente em temperaturas mais altas. A sobrevivência dos carrapatos normalmente é maior em temperaturas mais frescas e umidade mais alta, porém uma variedade de condições climáticas são bem toleradas (KOCH e TUCK, 1986). Apesar de serem facilmente vistos quando se alimentando em seu hospedeiro ou quando procuram por ele, os carrapatos se escondem em frestas e locais fora de vista para digerirem o sangue, realizarem postura e mudarem de estágio. Tal comportamento pode parecer um desaparecimento e reaparecimento da infestação, quando na verdade o domicílio nunca esteve livre da infestação (LABRUNA e PEREIRA, 2001).

O ciclo completo do carrapato dura no mínimo dois meses. Todavia, com a escassez de hospedeiros e em temperaturas mais baixas esse período pode aumentar significativamente. Carrapatos são pestes resistentes e cada estágio pode ficar de três a cinco meses sem se alimentar. Em média, dois ciclos completos se dão em um ano, podendo chegar até a quatro em climas tropicais (LOULY et al. 2007)





**Figura 4:** Todos os estágios de uma fêmea de *R. sanguineus*: 1-Fêmea ingurgitada realizando postura; 2- larva (seta), 3- larva ingurgitada; 4- ninfa; 5- ninfa ingurgitada; 6- da menor pra maior: neógina, partenógina e teleógina; 7- Fêmea ingurgitada

#### 2.4.2. *Ehrlichia canis*

O ciclo de *E. canis* possui três fases principais: a invasão de leucócitos mononucleares por corpos elementares inoculados pelo vetor, onde permanecem em crescimento por aproximadamente 2 dias; multiplicação do agente, por um período de 3 a 5 dias, dentro do fagossomo das células mononucleares com a formação do corpo inicial; e formação das mórulas, sendo estas constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana. Os corpúsculos elementares são fagocitados por leucócitos mononucleares, porém a fusão fagossomo-lisossomo não ocorre em células infectadas, permitindo assim sua divisão e parasitismo de novas células (DAVOUST, 1993)

#### 2.5. Transmissão

Até o presente momento, a transmissão de *E. canis* pelo seu vetor se dá comprovadamente pela via intraestadial e transestadial. Na via intraestadial, o carrapato *R.*

*sanguineus* se alimenta no seu hospedeiro em uma situação de alta parasitemia adquirindo o patógeno que se multiplica nos tecidos do vetor, sendo capaz de transmitir o hemoparasita para um novo hospedeiro sem mudar de fase. Essa via de transmissão é mais observada em machos adultos, pela possível troca de hospedeiro à procura de novas fêmeas, em áreas que possuem mais de um animal (DANTAS-TORRES, 2010).

A via transtadiária ocorre quando o carrapato se alimenta do seu hospedeiro enquanto larva ou ninfa e cai para realizar a muda e na nova fase é capaz de transmitir o patógeno (FOURIE et al, 2013; IPEK, ÖZÜBEK e AKTAS, 2017).

A transmissão transovariana ocorre de uma geração para a próxima, e é definida pela transmissão transtadiária em uma alimentação do estágio imaturo de larva, que foi infectada dentro de sua progenitora. Alguns parasitas podem ser mantidos através desse tipo de transmissão por múltiplas gerações, enquanto outros necessitam de transmissão horizontal para se disseminarem. A transmissão transovariana se caracteriza pela infecção dos tecidos de órgãos reprodutivos da fêmea pelo parasita, proporcionando uma descendência capaz de transmitir o patógeno para um hospedeiro logo na primeira alimentação, ou combinada com a transmissão. Essa via ainda não foi comprovada para o patógeno *E. canis* no seu vetor, porém foi relatada a detecção do patógeno em ovários de carrapatos, sugerindo o contato íntimo do patógeno com a progênie de um carrapato infectado (BARKER e REISEN, 2019).

Após encontrar um hospedeiro susceptível, o carrapato escolhe um local para sua alimentação (os locais de predileção costumam ser entre os dígitos, nas orelhas, no dorso, nas axilas e região inguinal) (Figura 5), rompendo a pele com o hipostômio e fixando-se com uma secreção denominada cimento (KOCH, 1982). A transmissão do patógeno pode ocorrer a partir de três horas desde o momento da fixação (FOURIE et al., 2013), e se dá através da secreção salivar do carrapato, onde se encontra o patógeno, além de substâncias que auxiliam na ingestão de sangue (vasodilatadores, anticoagulantes, imunomoduladores, entre outras). Algumas dessas substâncias presentes na saliva contribuem para a transmissão de outros patógenos presentes nos vetores para seus hospedeiros. A caracterização dessas substâncias e o entendimento de suas funções pode levar à descoberta de vacinas contra doenças transmitidas por carrapatos (NUTALL, 2018).

O cão também pode adquirir o patógeno através de transfusão sanguínea, embora seja raro (EWING e BUCKNER, 1965).





**Figura 5:** A- carrapatos adulto no dorso de um cão; B e C- Ninfas ingurgitadas na orelha de um cão. Fonte: arquivo pessoal.

## 2.6 Fatores de risco

### 2.6.1. Fatores intrínsecos

A EMC não apresenta predisposição de sexo ou idade, podendo ocorrer em todas as raças. Todavia, há evidências que apontam para a raça Pastor Alemão como mais susceptível à infecção por *E. canis*, e a doença é mais severa e apresenta um pior prognóstico nestes cães (HARRUS et. al., 2007). A diferença de suscetibilidade verificada entre raças pode ser atribuída à diferente capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular e/ou humoral adequada. Já foi demonstrado que a resposta imunológica celular contra *E. canis* é menor em Pastores Alemães quando comparados aos cães da raça Beagle (NYINDO et al., 1980), sem que haja diferença na resposta humoral entre os mesmos. Este fato sugere que a resposta celular é o componente mais importante do sistema imunológico, promovendo proteção contra este agente (HARRUS et al., 1999).

## 2.6.2. Fatores extrínsecos

A presença de carrapatos está diretamente associada à infecção e manifestação da erliquiose nos cães. Logo, alguns fatores como o contato com outros cães, acesso livre à rua, matas e corpos d'água são fatores de risco. Alguns estudos apontam um caráter sazonal da EMC, sendo observada predominância de quadros clínicos na estação chuvosa (abril a setembro, os meses da primavera e verão) (AZEVEDO et al., 2011; FERREIRA et al., 2012). Cães residentes em áreas rurais e peri-urbanas possuem maior índice de positividade para *E. canis*. Isso pode ser atribuído ao ambiente mais propício ao desenvolvimento do carrapato, pois casas com quintal apresentam um ambiente mais atrativo do que condomínios e grandes edifícios em centros urbanos (PAULINO et al., 2018).

## 2.7 Altitude

A epidemiologia moderna busca relacionar as doenças aos mais diversos fatores, com a finalidade de elucidar os mecanismos pelos quais elas se comportam em uma determinada população. A altitude é parte do escopo geográfico no cenário do estudo de uma doença, e se relaciona intimamente com outros aspectos como a temperatura, clima, pressão atmosférica e pluviosidade (MENDONÇA, DANNI-OLIVEIRA, 2007, JESUS, 2010). A interação entre essas áreas compreende a geografia médica. Lacaz et. al. descreveram em sua obra intitulada “Introdução à geografia médica no Brasil” em 1972 que “...sob o ângulo da geografia médica, devemos considerar, ao lado do agente etiológico, do vector, do reservatório, do hospedeiro intermediário, [...] os fatores geográficos representados pelos fatores físicos (clima, relevo, solo, hidrografia, etc.)...”. Estudos recentes apontam para a dissimilaridade genética entre as populações de carrapatos *R. sanguineus* s.l. que vivem em climas distintos, possuindo inclusive isolamento reprodutivo entre si, e tal disparidade resultou na nomeação de cada linhagem baseado no clima onde vivem (tropical e temperada) (SZABO et. al., 2005; DANTAS-TORRES, 2008; BURLINI et. al., 2010; MORAES-FILHO, 2013; DANTAS-TORRES, OTRANTO, 2015; NAVA, 2015; DANTAS-TORRES, 2018).

Estudos geoclimáticos do nosso Estado evidenciam regiões com climas acentuadamente distintos. A região da baixada fluminense, caracterizada por baixa amplitude de relevo, se localiza entre a faixa litorânea e o início de cadeias montanhosas da região

serrana. É o maior domínio geoclimático do estado, sendo classificado como Tropical Úmido. A região serrana se caracteriza por amplitudes topográficas significativamente elevadas e temperaturas excessivamente baixas, com clima Subtropical Super úmido. Já o médio vale do rio Paraíba do Sul possui altitudes mais próximas porém um pouco mais elevadas que a região de baixada, é composta de vales, com rica bacia hidrográfica, incluindo o Rio Paraíba do Sul, e parcialmente por mar de morros. O clima nessa região varia entre Subtropical Sub úmido e úmido (DANTAS et. al, 2005; CRONEMBERGER et. al., 2011).

Quanto à pluviosidade, a região serrana apresenta médias anuais mais elevadas (entre 1900-2000 mm aproximadamente), enquanto as restantes citadas ficam em torno de 1450 – 1600 mm anuais (SOBRAL et. al., 2018).

O perfil geográfico de doenças transmitidas por carrapatos vem sofrendo transformações em alguns países, principalmente devido à mudanças climáticas globais e pela influência antropológica no meio ambiente (BANETH et al., 1996; DE LA FUENTE et. al. 2008; DANIELOVA et. al, 2010; MEDLOCK et. al., 2013; MATEI et al., 2017).

Em temperaturas mais baixas ocorre menor proliferação de carrapatos, menor abundância e conseqüente dificuldade de circulação do patógeno entre vetor e hospedeiros (LABRUNA, 2001). Todavia, há uma escassez de estudos em diferentes altitudes no Rio de Janeiro para o agente e vetor em questão.

## **2.8. Sinais Clínicos**

A EMC possui um período de incubação de oito a vinte dias, seguidos sequencialmente de fase aguda, fase subclínica e em alguns casos fase crônica. Na fase aguda a doença se manifesta com diferentes sinais, que incluem prostração, perda de peso, anorexia, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia, uveíte e distúrbios hemorrágicos (petéquias e equimoses). Sinais neurológicos podem decorrer como conseqüência de meningite ou hemorragia nas meninges. A fase subclínica é caracterizada pela ausência de sinais clínicos. Por razões ainda não bem esclarecidas, apenas alguns animais progridem para a fase crônica, que é caracterizada por sinais parecidos com os da fase aguda, porém mais severos. Observa-se mucosas pálidas, fraqueza, sangramentos e perda de peso significativa (HARRUS e WANER, 2011).

Os principais achados hematológicos incluem trombocitopenia, anemia leve e leucopenia leve durante a fase aguda, trombocitopenia leve durante a fase subclínica, e pancitopenia na fase crônica (NAKAGHI et al., 2008). É importante ressaltar que a manifestação da doença depende da patogenicidade de diferentes linhagens de *E. canis*, e também da coinfeção com outros agentes transmitidos por carrapatos como *Babesia vogeli*, *Anaplasma platys* e *Hepatozoon canis*. (GAL et al., 2007).

## 2.9. Diagnóstico

O Diagnóstico da EMC é realizado pela interpretação do histórico do animal (pertence ou fez visita a uma área endêmica, foi infectado por carrapatos), pela presença dos sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com a doença e por testes específicos para *E. canis*.

A trombocitopenia é o achado hematológico mais comum para a EMC, estando presente em mais de 80% dos casos em qualquer fase da doença. Todavia, um índice de plaquetas normal não exclui a possibilidade da doença. Outros sinais observados são anemia não-regenerativa, leucopenia, neutropenia (leucocitose leve a moderada e neutrofilia podem ser raramente observados), linfopenia ou linfocitose leve (DE CASTRO et al., 2004). Na fase subclínica, os sinais mais comuns são trombocitopenia leve à moderada e anemia (CODNER, FARRIS-SMITH, 1986).

Em um estudo com animais naturalmente infectados por *E. canis* (EMC aguda, diagnóstico presuntivo), a sensibilidade do diagnóstico através de esfregaço de capa leucocitária (revisão de 1000 lâminas em óleo de imersão, objetiva de 100x), citologia de linfonodo (500 campos em óleo de imersão, objetiva de 100x) ou as duas técnicas combinadas foi de 66%, 61% e 74%, respectivamente (MYLONAKIS et al., 2003).

Os testes sorológicos são largamente utilizados para confirmar a exposição do animal ao agente (HARRUS e WANER, 2011). O teste de Fluorescência Indireta é considerado padrão-ouro para detecção e titulação de anti-corpos contra *E. canis*, ainda que o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) seja utilizado rotineiramente através da comercialização de kits comerciais (HARRUS et al., 2002). A titulação de IgG considerada positiva para *E. canis* para muitos laboratórios é igual ou maior que 1:80. Os anticorpos surgem na circulação de 7 a 35 dias após a infecção, e não são correlacionáveis com o estágio atual da doença, a duração da infecção ou a presença e morbidez do quadro clínico.

O desenvolvimento de testes moleculares para detecção de espécies de *Ehrlichia* spp. demonstrou um avanço na rapidez, sensibilidade e especificidade necessárias para um bom diagnóstico. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é utilizada para amplificar um pequeno fragmento específico dentro de uma amostra complexa de DNA purificado através de um método de extração. O teste necessita de reagentes inespecíficos como nucleotídeos, solução tampão com o íon magnésio e a enzima DNA polimerase termoestável (Taq polimerase), e outros específicos como os iniciadores e sondas, sendo estas utilizadas na técnica de PCR em tempo real (qPCR). Alguns genes já foram utilizados como alvo para a PCR, entre eles o gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal, para a proteína de formação de ponte dissulfeto (*dsb*) e para a proteína de membrana de 28 KDa (*p28*) (DOYLE et al., 2005).

As técnicas moleculares superam as limitações dos testes sorológicos por detectarem o patógeno diretamente através da amplificação de seu material genético em uma amostra, revelando se há uma infecção naquele momento ou não, em contraposição à sorologia que revela apenas se o organismo do animal teve exposição ao patógeno, em um período de tempo amplo. (WEN et al, 1997). O isolamento e a cultura de bactérias patogênicas, apesar de ser um teste de alta especificidade, pode demorar de dias a semanas, enquanto um resultado de PCR pode sair em até 24 horas.

Atualmente, qPCR vem apresentado bons resultados na detecção de patógenos transmitidos por carrapatos em amostra de sangue. Esta técnica se baseia na captação de um sinal luminoso por um aparelho quando há amplificação de material genético na amostra testada. Comparada ao ensaio da PCR convencional, possui mais rapidez por dispensar a etapa de eletroforese em gel de agarose, contribui para menor contaminação do laboratório pois não há manipulação de amplicon e podem utilizar marcadores moleculares específicos (sondas) quando no sistema Taqman, otimizando a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do teste (LEUTENEGGER, 2001).

Contudo, técnicas moleculares possuem suas limitações. Dentre elas, as principais são: necessitam de aparelhos de última geração e reagentes dispendiosos; são bastante vulneráveis a contaminação, exigindo bastante experiência em técnicas de laboratório e cuidados excessivos por parte do operador (RAJAPAKSHA. 2019).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição da Área de Estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 6).

*Coordenadas Geográficas:*

Paracambi (Latitude: 22° 36' 41" Sul, Longitude: 43° 42' 34" Oeste)

Barra do Piraí (Latitude: 22° 28' 12" Sul, Longitude: 43° 49' 32" Oeste)

Petrópolis (Latitude: 22° 30' 17" Sul, Longitude 43° 10' 56" Oeste)

Teresópolis (Latitude 22° 24' 44" Sul, Longitude: 42° 57' 59" Oeste)

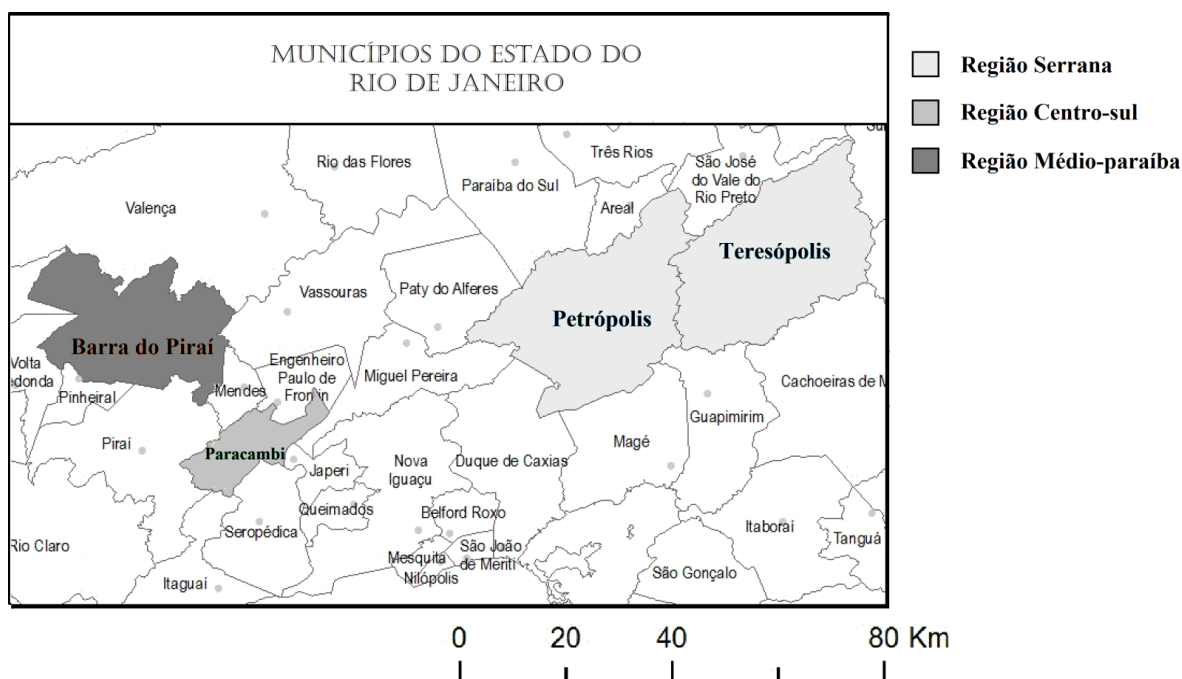
O município de Paracambi, localizado em região de baixa altitude no Rio de Janeiro, possui clima tropical com estação seca, com temperaturas mínimas variando entre 15 e 20°C e máximas entre 24 e 29 °C, anualmente. A pluviosidade anual total possui média de 1465 mm. Classificado como Aw pelo Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007, SOBRAL et. al, 2018), possui chuvas abundantes no verão e invernos secos.

O município de Barra do Piraí, localizado em região de baixa a média altitude no Rio de Janeiro, possui clima com a mesma classificação, com temperaturas mínimas variando entre 14 e 19°C e máximas entre 23 e 27 °C, anualmente. A pluviosidade anual total possui média de 1560 mm.

Petrópolis, localizada em região serrana no referido estado, possui um clima tropical de altitude, classificado como Cwb pelo Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007, SOBRAL et. al., 2018), com verões pouco quentes e chuvosos e invernos frios e secos. A temperatura mínima varia entre 8 e 17 °C e as máximas entre 22 e 28 °C. A pluviosidade anual média é de 1900 mm, porém por ser localizada em grande altitude, as massas de ar quentes e úmidas quando são obrigadas a subirem devido ao relevo e chegam a 2000 metros, encontram o ar frio e resultam em precipitações muito acima da média, podendo ser inclusive catastróficas (LOPES et al., 2003).

Teresópolis, município vizinho de petrópolis, possui a mesma classificação climática e altitude ligeiramente superior, temperaturas mínimas variando entre 10 e 16 °C, e máximas

entre 21 e 27 °C. A pluviosidade anual possui média de 1620 mm, com a mesma característica de chuvas fortes no verão devido ao relevo como Petrópolis.



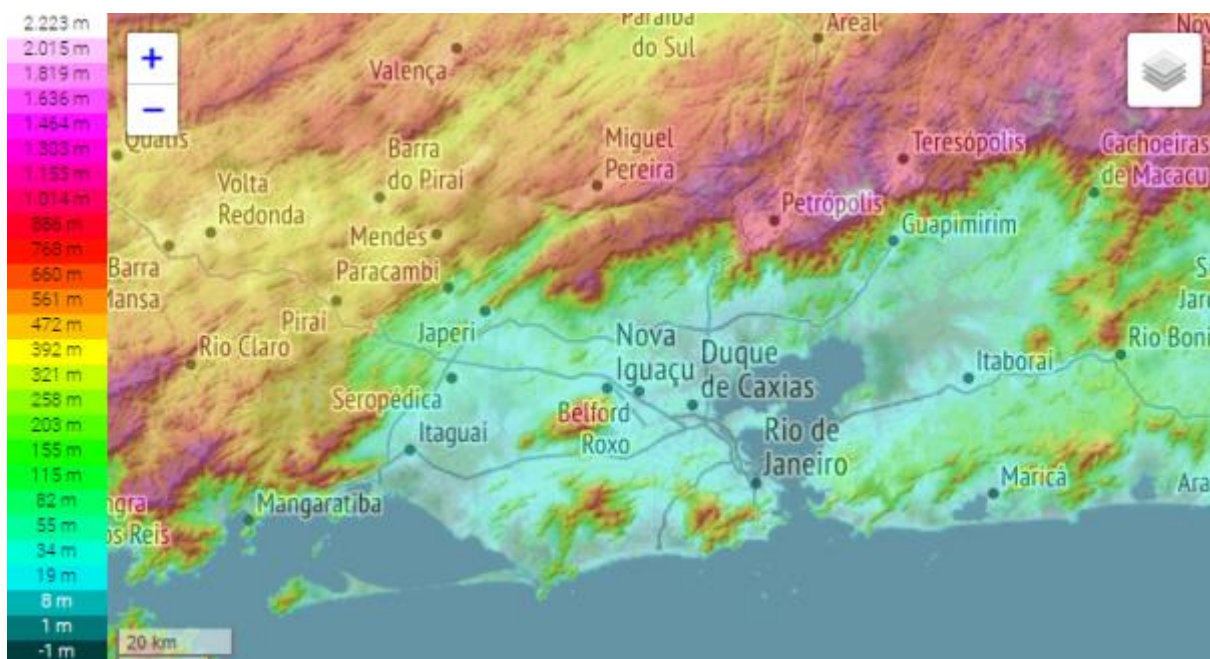
**Figura 6:** Mapa do estado do Rio de Janeiro, com distinção de regiões administrativas. Fonte: MAPAS PARA COLORIR (2019).

### 3.2 Questionários Epidemiológicos

Foi aplicado um questionário epidemiológico aos tutores dos animais em forma de entrevista com o objetivo de reunir informações sobre a propriedade, os animais e o manejo dedicado a eles, buscando relacionar esses fatores com a infecção por *E. canis*. Dados coletados sobre os animais indagam sobre aspectos intrínsecos deste, como a origem, idade e sexo, e fatores extrínsecos como assistência veterinária, histórico de doenças, alimentação, abrigo, medidas profiláticas contra ectoparasitas, entre outros. Em seguida foi realizado o exame físico do animal, observou-se as mucosas, palpou-se linfonodos, abdômen, aferiu-se frequência cardíaca, respiratória e temperatura. Foi reportado também o nível de infestação por quaisquer ectoparasitas encontrados, A infestação nos animais variou entre nula (nenhum parasito) baixa (de um a dez parasitos), média (dez a trinta) e alta (mais de 30). O questionário na íntegra e o termo de consentimento livre e esclarecido se encontram no ANEXO I.

### 3.3 Coletas de carrapatos em diferentes altitudes

Os carrapatos foram coletados mensalmente, durante o período de novembro de 2018 a outubro de 2019, nos quatro municípios do Estado do Rio de Janeiro descritos acima. A Figura 7 detalha as diferenças de altitude na região. Foram selecionadas residências que possuíam cães pela vontade do proprietário de participar do estudo nas zonas urbanas e rurais de cada município, e com a autorização do tutor, realizado a catação de carrapatos durante 15 minutos em cada animal, ocasionalmente com o auxílio de pente fino, e a procura no ambiente por carrapatos pelo mesmo intervalo de tempo. Os ectoparasitas foram acondicionados em tubos de ensaio de 13 x 100 mm tampados com algodão, identificados com o número da propriedade e nome do animal dos quais foram coletados, armazenados em estufa B.O.D. e processados no dia seguinte.



**Figura 7:** As altitudes de cada município estudado variam da seguinte maneira, aproximadamente: Paracambi: 0 – 450 m; Barra do Piraí: 300 – 750 m; Petrópolis: 650 – 1050 m; Teresópolis: 750 – 1050 m. Fonte: TOPOGRAPHIC-MAP.COM.



### **3.4 Identificação morfológica**

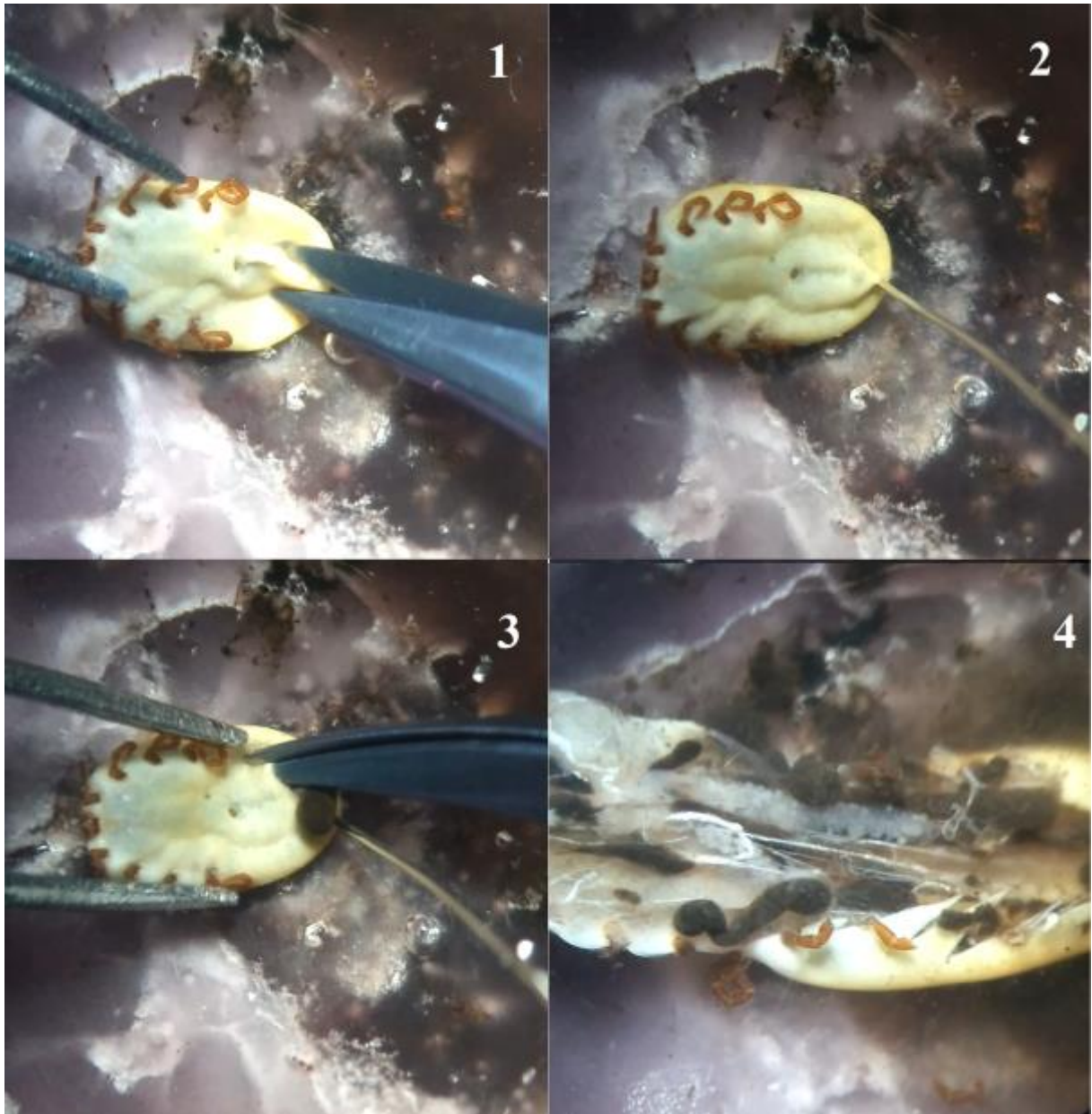
A identificação dos espécimes de carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus* coletados foi realizado com auxílio da chave dicotômica descrita na literatura por BARROS-BATTESTI (2006). Ninfas de carrapatos do gênero *Amblyomma* foram identificados utilizando a chave de Martins (2011), enquanto as larvas foram identificadas em nível de gênero (BARROS-BATTESTI, 2006). Para melhor visualização dos espécimes e seus detalhes morfológicos, foi utilizada uma lupa estereoscópica Nikon® MODEL C-LEDS com capacidade máxima de aumento de 35 vezes.

### **3.5 Processamento e armazenamento de ectoparasitas**

As larvas, ninfas, fêmeas jovens pequenas demais para dissecar e machos passaram por um processo de limpeza para remover eventuais sujidades, sendo mergulhados em uma solução de hipoclorito à 0,2% e depois em uma solução de PBS 1x e então armazenados em microtubos de 1,5 ml do tipo “eppendorf” com um volume de RNA later a depender do tamanho do espécime, variando de 30 a 60 ul e guardados no freezer à -20 °C. Esses exemplares não passaram por protocolo de extração de material genético.

As fêmeas ingurgitadas, grandes o suficiente para serem dissecadas, foram limpas pelo mesmo processo e então dissecadas pela técnica descrita por EDWARDS, GODDARD e VARELA-STOKES (2009) adaptada. O processo de dissecação é realizado com o espécime submerso em PBS 1X, previamente resfriado em geladeira, em uma placa de Petri pequena repleta com cera de cor preta, para melhorar o contraste entre os órgãos do carrapato, principalmente o ovário ainda em fase de desenvolvimento e as glândulas salivares, por terem cor mais clara. Cada fêmea foi separadamente posicionada em decúbito dorsal e utilizando uma tesoura oftálmica foi feita uma abertura na cutícula na sua extremidade posterior. Através dessa abertura foi inserido um alfinete entomológico para a fixação do espécime na cera. A cutícula foi cuidadosamente cortada com a tesoura das extremidades da abertura inicial, percorrendo as duas laterais até a altura da coxa 2. A porção ventral da cutícula foi então rebatida para o lado oposto e fixada com outro alfinete, permitindo a visualização dos órgãos. Nesse momento, todos os fragmentos de órgãos identificados (intestino, ovário e glândula salivar) foram separados, lavados com PBS 1x em uma nova placa de Petri e armazenados

individualmente em um micro tubo de 1,5 ml com tampa e 60  $\mu$ l de RNA later até a extração do material genético. Antes de iniciar a dissecação de uma nova fêmea, os instrumentos e a placa de petri com cera foram desinfetados com álcool 70%.



**Figura 8:** Fotos da dissecação de uma fêmea de *R. sanguineus*. 1- pique inicial; 2- fixação do alfinete entomológico; 3-corte na cutícula nas laterais; 4- órgãos internos de uma fêmea de carrapato.

### 3.6 Extração de DNA

O DNA dos órgãos de carrapatos foi extraído individualmente. Isso significa que para cada carrapato dissecado, foram obtidas três amostras de DNA, uma de cada órgão (intestino, ovário e glândula salivar). Previamente à extração, as amostras foram lavadas por três vezes com 0,5 mL de PBS 1X e descartado o sobrenadante, com a finalidade de retirar o conservante no qual os fragmentos se encontravam. Posteriormente, o DNA genômico foi extraído utilizando-se um Kit comercial de extração de DNA (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen®, Texas, USA). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria com o aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA). O volume final de eluição foi de 60 µL, e esse volume foi separado em três alíquotas de mesmo volume. O protocolo de extração se encontra no ANEXO II.

### 3.7 PCR em tempo real

A detecção de *E. canis* foi feita por meio da técnica de qPCR descrita por PELEG et. al (2010), para amplificação de um fragmento de 88 bp da sequência 16S *rDNA*, utilizando os primers *E.c* 16S fwd (TCGCTATTAGATGAGCCTACGT) e *E.c* 16S rev (GAGTCTGGACCGTATCTCAGT). A sonda de hidrólise foi marcada na extremidade 5' com o repórter FAM e na extremidade 3' com o quencher TAMRA (5'Fam/GTCTGAGAGGACGATCAGCCACACT/3'TAMRA). Foi usado o reagente TaqMan® Universal PCR Master Mix, acompanhado do controle interno de amplificação TaqMan® exogenous Internal Positive Control Reagents (IPC). A reação teve volume final de 10 µL, sendo composta de 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1 µL de Master Mix IPC, 0,2 µL de DNA EXO, 1 µL de sonda a 2,5 µM (concentração final de 0,25 µM), 0,8 µL de solução de Primer forward e reverse a 6,25 µM (concentração final de 0,5 µM) e 2 µL da amostra de DNA a ser testada. A reação foi realizada no equipamento StepOne Real-time PCR System (Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, EUA) com as seguintes condições de termociclagem: uma etapa de desnaturação inicial, consistindo de cinco minutos a 95 °C, seguida de 45 ciclos de 20 segundos a 95 °C e 60 segundos a 60 °C. Para controle positivo, foram utilizadas amostras de DNA de *E. canis* provenientes de cultivo celular, gentilmente cedidas pela Prof. *PhD* Cláudia Bezerra da Silva. Foi utilizado como

controle negativo água ultrapura. Para monitorar a possibilidade de contaminação, um controle positivo foi pipetado antes de pipetar as amostras, e outro após a última amostra, seguido da pipetagem do controle negativo. Todas as amostras e os controles foram realizados em duplicatas. Foram consideradas positivas amostras com ambas duplicatas com o valor de Cq inferior a 40 ciclos. Foi adotado um critério para considerar os carrapatos positivos, se baseando na detecção do material genético do patógeno nas amostras de seus órgãos por qPCR. Carrapatos cujas amostras de glândula salivar foram reativas no qPCR, foram considerados positivos. Aqueles que as amostras de glândula salivar foram negativas, mas as amostras de intestino e ovário ambas foram positivas, também foram considerados positivos. Quando apenas o ovário ou apenas o intestino foram positivos, estes carrapatos não foram considerados positivos. Tal critério foi adotado para classificar um carrapato como infectante baseado na positividade para cada órgão pelo qPCR, considerando a lógica das formas de transmissão desse patógeno na natureza que foram comprovadas até hoje.

### **3.8 Genotipagem da linhagem dos espécimes de *R. sanguineus***

#### **3.8.1 PCR convencional para o gene 16S rDNA**

As amostras de material genético de intestino dos carrapatos considerados positivos para *E. canis* na etapa anterior de qPCR foram submetidas a um PCR convencional para o gene de aproximadamente 460 pb que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rDNA) utilizando os iniciadores 16S rDNA forward (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3') e 16S rDNA reverse (5'-GCT CAA TG TTT TTT AAA TTG CTG T-3') (MANGOLD et al, 1998). O volume final da reação foi de 18,75 µL, contendo 1,25 µL de Tampão 10X Platinum® Taq DNA Polymerase, 0,625 µL de cloreto de magnésio a 2,5 mM, 1 µL de dNTPs a 2,5 µM, 0,5 µL da solução de trabalho contendo os dois primers a 10 pmoles/µL, 0,075 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) 5 U/µL e 2 µL da amostra de DNA. As condições de termociclagem foram: pré-aquecimento à 94° C por sete minutos, sete ciclos constituídos por três etapas, a primeira de 94° C por vinte segundos, a segunda de 47° C por vinte segundos e a terceira de 72° C por vinte segundos. Em seguida foram realizados 38 ciclos constituídos por três etapas, a primeira de 94° C por 20 segundos, a segunda de 50° C por 20 segundos e a

terceira de 72° C por 20 segundos. Essa técnica tem por objetivo permitir que os iniciadores anelem a uma temperatura mais baixa nos primeiros sete ciclos, já que não possuem uma complementaridade perfeita com seu alvo, garantindo a amplificação desse trecho nos 38 ciclos seguintes. Em todas as reações, foi utilizado um controle positivo de *R. sanguineus* previamente sequenciado e diluições seriadas de (1:10, 1:100, 1:1000) de DNA extraído de *Amblyomma romarioi* para medir o limite de detecção da técnica, fornecendo um meio para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Foram utilizados dois controles negativos nos quais o volume que seria de amostra foi substituído por água ultrapura. O primeiro controle negativo foi preparado no mesmo ambiente de mistura de reagentes enquanto o segundo foi preparado depois de pipetadas todas as amostras, para que fosse verificado se houve contaminação por pipetagem no preparo da reação.

### **3.8.2 Avaliação do produto amplificado**

Para avaliar a eficácia da reação, um volume de 5 µL do produto final de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando um tampão de corrida Tris-Acetato EDTA (TAE) (0,5X = 20 mM de Tris-base, 10 mM de ácido acético; 0,5 mM de EDTA – pH 8) em voltagem constante de 5 V/cm durante 40 minutos. A determinação dos tamanhos dos produtos foi feita através da comparação visual com marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, código 13-4007-01, LGC tecnologia, São Paulo, Brasil). Os géis foram corados através de submersão em brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante dez minutos, submergidos em água durante 30 minutos, depois observados e digitalmente registrados em transiluminador (Figura 4). O volume restante foi estocado a -20° C para análises posteriores.

### **3.8.3 Padrão de fragmentos de digestão enzimática (RFLP)**

Para a digestão dos fragmentos amplificados foram utilizadas as enzimas *Vsp I* e *Dra I* em reações monoenzimáticas (cada amostra foi submetida à digestão com as enzimas separadamente) para diferenciar as linhagens tropical e temperada de *R. sanguineus*. Cada reação de digestão teve volume total de 15 µl, contendo 5,56 µL de água, 1,2 µL de solução tampão (10X) própria de cada enzima, 0,12 µL de soroalbumina bovina (10 mg/µL –

Promega), 0,12 µL de enzima de restrição (10 U/µL) e 5 µL do produto amplificado. As amostras foram incubadas a 37° C por três horas. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) (44,5 µM Tris-base; 44,5 µM Borato; 1 mM EDTA – pH 8) em voltagem constante de 5 V/cm, durante 150 min. A análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (50 pb Ladder, Produto M1041. Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil.) O processo de coloração e captura de imagem foi realizado como descrito na etapa anterior.

### 3.9 Análise dos dados

A comparação estatística entre algumas variáveis determinadas pelo questionário epidemiológico e a presença de DNA de *E. canis* em órgãos de carrapatos foi realizada através do teste do Qui-Quadrado, utilizando o programa BioEstat, versão 5.0. Para calcular o N amostral (número de propriedades a se visitar para possuir relevância estatística), foi utilizada a fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \alpha / 2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

Sendo as variáveis: n – Número de amostras;  $Z^2 \alpha / 2$  – Valor crítico tabelado para IC 95 %; p – probabilidade de ocorrer um evento; q – 1-p;  $E^2$  – Margem de erro.

Por não se saber a média de infectividade de *E. canis* por carrapato nessa região, considera o valor de p sendo 0,5, ficando (LEVINE et. al., 2000):

$$n = \frac{1,95^2 \times 0,25}{0,0025} = 384,16 = 385 \text{ propriedades}$$

### **3.10. CEUA**

O uso dos animais envolvidos no trabalho foi previamente aprovado pelo CEUA/IV/UFRRJ (Comissão de Ética no Uso de Animais, Instituto de Veterinária), processo número 3915240616/ ID 000585. Todos os procedimentos foram realizados por médicos veterinários com experiência na manipulação de animais para fins de pesquisa.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Carrapatos coletados

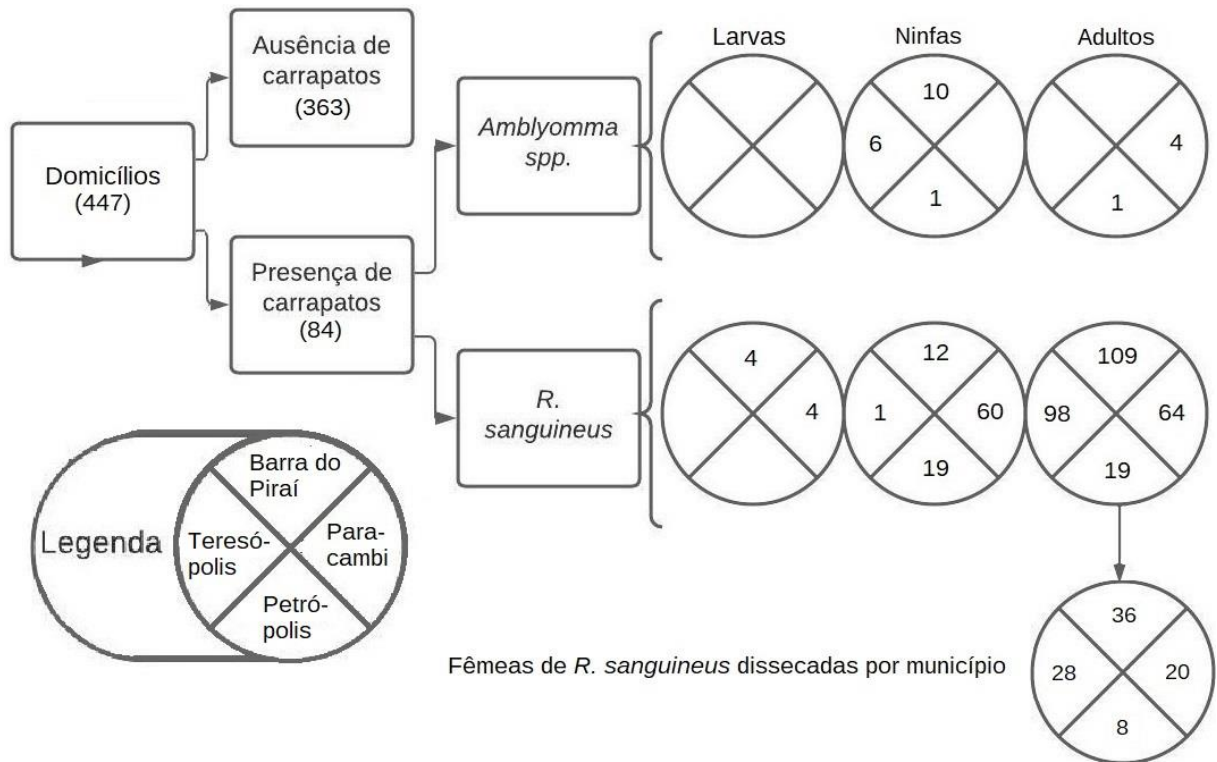
Do período entre novembro do ano de 2018 e outubro de 2019, foram visitadas 447 propriedades. Em 84 delas foram encontrados carrapatos.

No total, foram coletados 412 carrapatos, sendo oito larvas, 109 ninfas e 295 adultos. Todas as larvas foram identificadas como *R. sanguineus* s.l., assim como 92 ninfas e 290 adultos. As 17 ninfas e cinco adultos restantes foram identificados como pertencentes ao gênero *Amblyomma* spp. Petrópolis foi o município com menor número de carrapatos coletados, contabilizando 19 fêmeas e 19 ninfas de *R. sanguineus*, e dois espécimes de *Amblyomma* spp. Teresópolis e Barra do Piraí foram semelhantes quanto ao número de carrapatos coletados, onde foram coletados 98 e 109 *R. sanguineus* adultos, respectivamente. Já em Paracambi, foi observado um número maior de estágios imaturos de *R. sanguineus*, totalizando 60 ninfas dessa espécie, e um número intermediário de adultos, correspondendo a 64. A distribuição por município das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* cujas disseções foram viáveis se encontra no círculo inferior (Figura 9).

### 4.2 Detecção molecular de *E. canis* através de qPCR de amostras de órgãos de carrapatos com alvo no gene 16S

Para a análise molecular, todas as fêmeas de *R. sanguineus* de tamanho suficiente para a disseção foram processadas, totalizando 86 indivíduos dos quais foram separadas amostras de intestino, ovário e glândula salivar. 15 carrapatos foram considerados positivos (17,44%) na qPCR pelo critério adotado. Dentre as 258 amostras de tecido de *R. sanguineus* testadas, 58 apresentaram resultado inconclusivo, isto é, uma duplicata positiva (Cq abaixo de 40) e outra negativa (Cq acima de 40 ou negativo). Outras 13 amostras apresentaram Cq acima de 40 e negativo para sua duplicata. Essas 71 amostras que apresentaram resultado inconclusivo foram novamente submetidas à reação de qPCR, resolvendo 59 delas. Dentre os 86 órgãos de cada tipo, 15 amostras de intestino, 15 de glândula salivar e 10 de ovário foram considerados positivos.

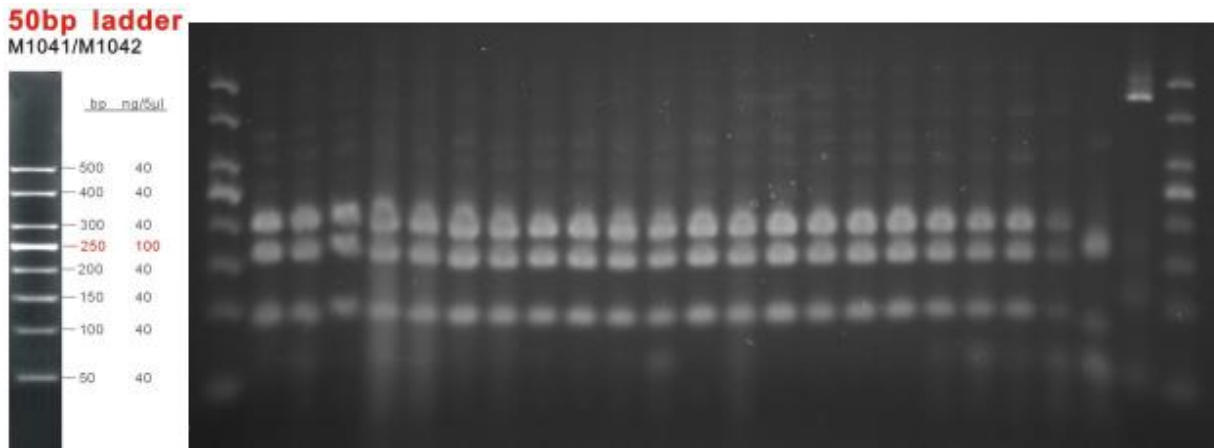




**Figura 9:** Organograma representando os espécimes coletados e quais foram dissecados por estágio e município.

#### 4.3 Identificação da linhagem de *R. sanguineus* por RFLP – PCR com alvo no gene mitocondrial 16S rRNA

Os 15 carrapatos positivos mais cinco carrapatos negativos para *E. canis* na qPCR foram testados com a técnica de RFLP para determinar a linhagem (tropical ou temperada). O padrão de bandas de todos os carrapatos foi compatível com a linhagem tropical de *R. sanguineus* nos dois ensaios enzimáticos realizados. A figura 10 mostra a imagem capturada com o aparelho transluminador, do gel correspondente à digestão pela enzima *Vsp I*.



**Figura 10:** Padrão de digestão da enzima *Vsp I*. A digestão segundo a literatura (PAIVA, 2019) produziria fragmentos de 194, 153 e 93 pares de base, podendo ser observado esse padrão no gel acima. O Ladder mostrado à esquerda foi inserido no primeiro poço começando pelo lado da esquerda do gel. Em seguida, vinte amostras do produto amplificado de DNA extraído de intestino de carrapatos. A vigésima primeira amostra é um controle positivo de *Rhipicephalus sanguineus*, sabidamente linhagem tropical através de sequenciamento. O vigésimo segundo poço é uma amostra de DNA de *Amblyomma romarioi*. A vigésima terceira é o controle positivo sem passar pela digestão, e finalmente, no último poço, novamente o Ladder.

#### 4.4 Análise Bivariada

As variáveis intrínsecas aos cães, como sexo e idade, não apresentaram relação com a positividade para *E. canis* nos seus carrapatos ( $p > 0,05$ ). No entanto, dentre as variáveis extrínsecas, a estação do ano (seca ou chuvosa) determinou uma diferença moderadamente significativa na presença de DNA de *E. canis* nos órgãos dos carrapatos, alcançando maiores taxas na estação seca em todos os municípios avaliados, e maior abundância de espécimes coletados nesse período menos chuvoso (Figura 11).

A chance de carrapatos apresentarem infecção por *E. canis* é 3,97 vezes maior na estação seca que na estação chuvosa (IC: 0,89 – 17,71,  $p < 0,05$ ).

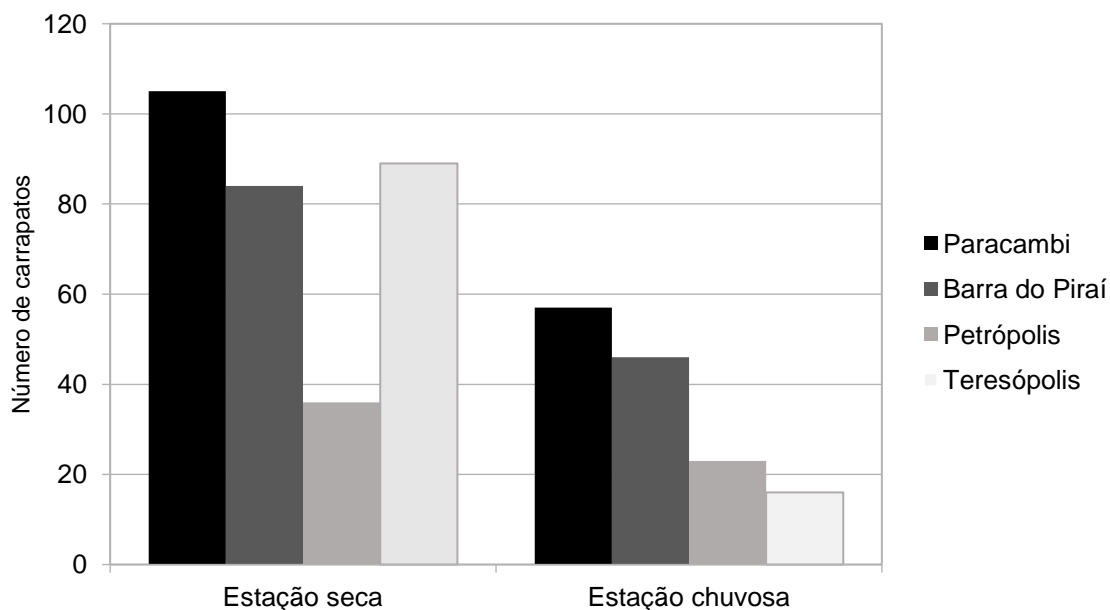
Os carrapatos coletados em cães domiciliados em alturas superiores a 650 m possuem uma chance 2,86 vezes maior de apresentar infecção por *E. canis* (IC: 0,9 – 9,15,  $p = 0,05$ ).

A variável acesso dos animais à mata não apresentou associação significativa com a positividade dos carrapatos para *E. canis*. Também não foi observado associação com as variáveis zona (rural ou urbana) (Figura 12), número de cães, assistência veterinária, presença de animais silvestres, limpeza do ambiente e uso de carrapaticidas (Tabela 1).

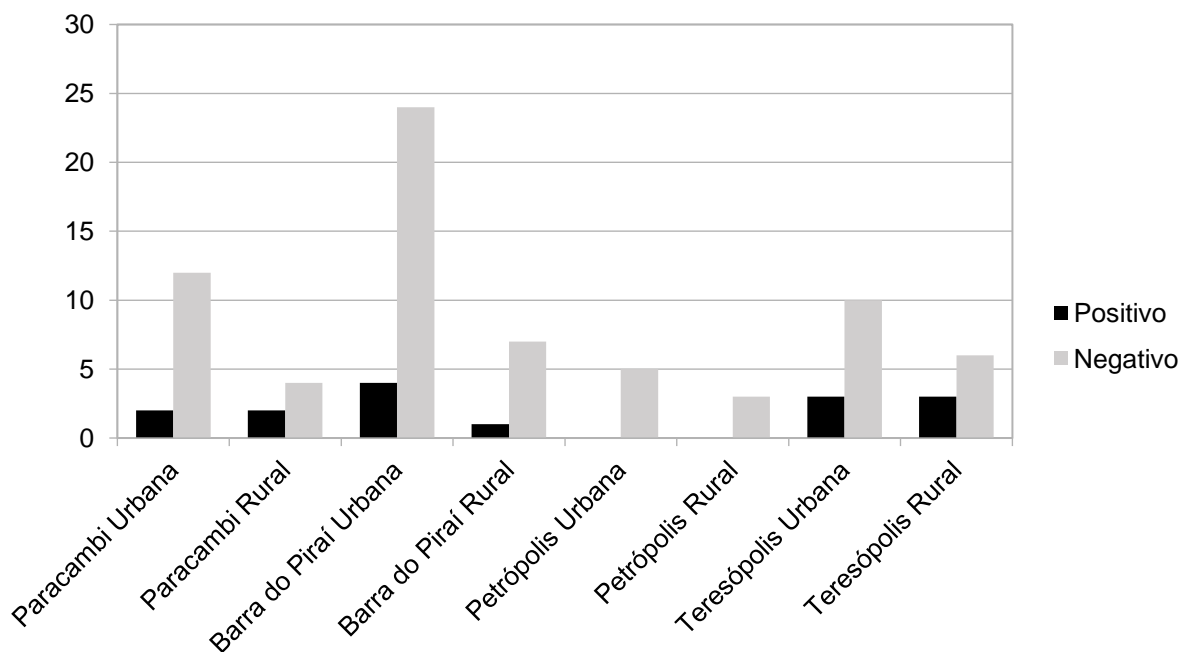
**Tabela 1:** Análise bivariada entre fatores epidemiológicos coletados no questionário, respondido por tutores de cães residentes em Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis associados com a infecção de *Rhipicephalus sanguineus* por *Ehrlichia canis* utilizando o teste do Qui-quadrado ou exato de fisher.

Variáveis	N	n Pos	% Pos	Razão de Frequência		
				p	RF	IC 95%
<b>Gênero</b>						
Fêmea	219	7	3,19	0,47	1,22	0,42 – 3,58
Macho	228	6	2,63			
<b>Idade</b>						
< 1 ano	273	6	2,19	0,19	1,87	0,64 – 5,46
≥ 1 ano	174	7	4,02			
<b>Zona</b>						
Rural	206	6	2,91	0,38	1,38	0,46 – 4,15
Urbana	241	8	3,32			
<b>Região</b>						
Serrana (> 650 m)	200	9	4,5	0,057	2,86	0,9 – 9,15
Baixada (≤ 650 m)	247	4	1,61			
<b>Estação</b>						
Seca	263	11	4,18	0,046	3,97	0,89 – 17,71
Chuvosa	184	2	1,08			
<b>Nº de cães</b>						
1	182	6	3,29	0,45	1,26	0,43 – 3,68
> 1	265	7	2,64			
<b>Acesso à mata</b>						
Sim	124	6	4,83	0,106	2,3	0,79 – 6,69
Não	323	7	2,16			
<b>Assistência veterinária</b>						
Sim	229	8	3,49	0,31	1,54	0,51 – 4,64
Não	218	5	2,29			
<b>Presença de silvestres</b>						
Sim	314	9	2,86	0,41	1,05	0,33 – 3,35
Não	133	4	3,00			
<b>Limpeza</b>						
Satisfatória	280	7	2,50	0,34	1,45	0,5 – 4,25
Não satisfatória	167	6	3,59			
<b>Uso de carrapaticida</b>						
Sim	282	9	3,19	0,42	1,33	0,42 – 4,24
Não	165	4	2,42			

Legenda: N – número de residências com cada tratamento; n pos – número de residências com carrapatos positivos por tratamento; n pos % - taxa (n pos/N); p – p- valor; RF – Razão de Frequência; IC – Intervalo de confiança.



**Figura 11:** Número total de carrapatos encontrados nas propriedades de cada município, representados individualmente por um tom de cinza. Foram considerados indivíduos em qualquer estágio e de todas as espécies (*Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum*). Em cada segmento das colunas, estão representados do lado esquerdo os seis meses mais secos (outubro a março) e do lado direito a estação chuvosa (abril a setembro).



**Figura 12:** Gráfico de positividade para as fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* dissecadas. A altura de cada barra indica o número de espécimes para cada classe do eixo x, separadas por municipalidade e zona. Barras pretas representam espécimes positivos e barras cinza espécimes negativos para qPCR com alvo no gene 16S rDNA de *Ehrlichia canis*.

## DISCUSSÃO

Comparando a frequência de positividade de carrapatos adultos nesse estudo (17,44%) com o estudo de Harrus et al. (2011) em Israel, foram obtidas taxas mais altas de infecção do carrapato *R. sanguineus* por *E. canis*, tendo sido encontrado uma taxa de 10,4% no referido estudo. Considerando que foi utilizada a mesma técnica e o mesmo alvo para a detecção molecular, a diferença pode ser atribuída ao fato de que os carrapatos capturados foram em sua maioria coletados no ambiente próximo de habitações e se encontravam não-ingurgitados, enquanto no presente estudo todos os espécimes foram coletados dos animais, ou no ambiente em fase adulta

Os estudos de Aguiar et al. (2007) em São Paulo mostraram frequências bem abaixo do que foi encontrado no presente estudo, variando entre 2,4 e 6,2%. A técnica utilizada nesse experimento foi PCR convencional para o gene *dsb*. A diferença dos resultados pode ser atribuída devido ao método de análise das amostras, agrupando os carrapatos em pools de três indivíduos, e considerando que apenas um indivíduo estava infectado com o resultado positivo do pool. Esse método de análise pode ter reduzido bastante a detecção do número real de carrapatos infectados, pois em um pool considerado positivo, poderia existir três carrapatos infectados em vez de um, e na análise adotada no trabalho esse número estaria sendo subestimado.

Costa (2016) relatou uma frequência de positividade mais baixa para *E. canis* em carrapatos ingurgitados coletados em animais no Mato Grosso (4,76%). A técnica utilizada foi de qPCR com alvo no gene *dsb*, e a diferença de positividade para esse estudo pode estar relacionada à metodologia, considerando que nesse estudo os carrapatos foram separados em grupos de três, utilizando adultos que não tinham realizado repasto na fase adulta.

Em estudos na Nigéria, Kamani (2013) e Ndip (2007) encontraram frequências de infecção maiores que no presente estudo (23,7 % e 21 %, respectivamente). A técnica utilizada nos dois estudos foi a qPCR, porém com alvos diferentes, sendo o gene 16S para o primeiro e o gene *dsb* para o segundo. As altas taxas encontradas refletem o caráter endêmico de *E. canis* nas regiões por eles estudadas.

No estudo de Souza et al. (2010) foi encontrada uma taxa de 21,9% de positividade para *E. canis* em carrapatos. A técnica utilizada foi Nested-PCR para o gene 16S. As amostras de DNA foram extraídas de “pools” de carrapatos, dificultando a comparação da frequência de positividade desse estudo. Todavia, no presente estudo foi possível determinar a infecção por *E. canis* de cada carrapato, separadamente. O fato de que foram encontrados carrapatos tanto positivos quanto negativos se alimentando ao mesmo tempo no mesmo animal corrobora com a suposição de que uma das principais formas do patógeno permanecer em circulação na população de cães e vetores é através da rickettsemia nos cães (AGUIAR, 2007).

A tipificação da linhagem de todos os espécimes de *R. sanguineus* utilizados no experimento foi compatível com a linhagem tropical, entrando em acordo com diversos estudos que dizem existir a linhagem temperada apenas na região sul do nosso país (MORAES-FILHO et al., 2011; SANCHES, 2013; DANTAS-TORRES e OTRANTO, 2015).

Considerando o ciclo de vida do carrapato do cão, é observado que ele passa a maior parte de sua vida no ambiente, sofrendo grande influência dos fatores ambientais e climáticos, procurando por um hospedeiro em épocas com condições mais favoráveis. No trabalho de Sanches (2013), as particularidades biológicas de carrapatos provindos de climas tropicais ou temperados foram comparadas, levando a entender que a taxonomia deve considerar as diferenças adaptativas entre as linhagens em relação ao clima (DANTAS-TORRES, 2008). No estudo de Levin et al. (2012), foi demonstrado que o cruzamento entre linhagens geograficamente distintas produziu híbridos inférteis, uma evidência que entra de acordo com essa classificação. Visto as diferenças entre as linhagens, foi investigada a presença daquela adaptada a climas temperados na região serrana do nosso Estado. Todos os carrapatos positivos para *E. canis* foram caracterizados como linhagem tropical, confirmando a competência vetorial dessa linhagem para *E. canis* como estudado por Moraes-Filho (2011). É possível afirmar que a linhagem tropical de *R. sanguineus*, única encontrada em nosso estudo, consegue se adaptar e manter-se circulante entre o ambiente e os cães mesmo nas áreas de estudo mais frias, de clima montanhoso da nossa região, mantendo a presença do patógeno nesse ciclo.

A diferença observada na presença de carrapatos coletados na estação seca ou na estação úmida entra em conflito com o estudo de Venzal (2007) e de Silveira et al. (2009),

que observaram maior presença de carrapatos na estação chuvosa, o primeiro no Paraguai e o segundo em Minas Gerais. Esse achado é reflexo do caráter cosmopolita do carrapato *R. sanguineus*, pois segundo o estudo de Adejinmi (2011), as chuvas possuem efeito deletério sobre a reprodução do carrapato. Logo, se supõe que os carrapatos nesses estudos não estavam sob influência direta da chuva, encontrando alojamento nas propriedades ou entorno que protegeram os parasitas e seus ovos do encharcamento.

## CONCLUSÃO

-A estação do ano correspondente aos meses mais secos favorece a positividade para *E. canis* no seu vetor biológico e esses, por sua vez, foram coletados em maior abundância na estação seca em todos os municípios estudados;

-Carrapatos em altitudes elevadas possuem maior taxa de infecção que seus semelhantes em áreas de baixada. Portanto, os hospedeiros vertebrados nos municípios de altitude elevada possuem mais chances de se infectarem com o agente;

-Em relação a outros fatores extrínsecos como: Zona (rural ou urbana), acesso à mata, número de animais por domicílio, assistência veterinária, presença de animais silvestres, limpeza do ambiente e o uso de produtos carrapaticidas não influenciaram a infectividade de carrapatos;

-Nas épocas de chuva (meses de verão) a presença do *R. sanguineus* nos municípios estudados foi menor do que nas épocas mais secas, comprovando o efeito deletério da pluviosidade particularmente elevada nessa estação sobre a reprodução do vetor, resultando na diminuição da presença deste parasito no ambiente, representando menor risco para os cães.



## REFERÊNCIAS

- ADEJIMNI, J. O. Effect of water flooding on the oviposition capacity of engorged adult females and hatchability of eggs of dog ticks: *Rhipicephalus sanguineus* and *Haemaphysalis leachi leachi*. **Journal of Parasitology Research**. v. 2011. p. 1-5. 2011.
- AGUIAR, D. M. et al. 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. 2007.
- ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. **Rio de Janeiro: NDLF. Livros**, 2002.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Canine ehrlichiosis – a review. **Revista Clínica Veterinária**, n. 19, p. 31-38, 1999.
- ANDRIC, B. Diagnostic Evaluation of *Ehrlichia canis* Human Infections. **Open Journal of Medical Microbiology**. v. 4, p. 132-139. 2014.
- AZEVEDO, S. S. et al. Seroprevalence and risk factors associated do *Ehrlichia canis* in dogs from the semiarid of Paraíba state, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 48, n. 1. 2011.
- BANETH, G. et al. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **The veterinary record**. v. 138, p. 257-259. 1996.
- BARKER, C. M.; REISEN, W. K. Epidemiology of Vector-Borne Diseases. **Medical and Veterinary Entomology**. cap. 4, p. 33–49. 2019.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. **São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan**. 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Mudanças climáticas. 28 de agosto de 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-ambiental/vigidesastres/mudancas-climaticas>>. Acesso em 12/10/19.

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

BURLINI, L. et. al. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**. v. 50, n. 4, p. 361-74. 2010.

CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 189, p. 47-50. 1986.

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

COSTA, J. S. Detecção molecular de *Ehrlichia canis* em cães e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* de cães e ambiente domiciliar em Cuiabá, MT. **TCC (especialização em medicina veterinária) – Universidade Federal do Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Cuiabá. 2016.**

CRONEMBERGER, F. M. et. al. Mapeamento Bioclimático do Estado do Rio de Janeiro. **Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR, Curitiba, PR, Brasil. 2011.**

DANIELOVA, V. et. al. Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in altitudinal limit of distribution of

their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonoše mountains, Czech Republic). **Vector Borne Zoonotic Diseases** v. 10, n. 3, p. 223-30. 2010.

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

DANTAS, M. E. et. al. Diagnóstico Geoambiental do Estado do Rio de Janeiro. **CPRM, Brasília**. Disponível em: < [http://arquivos.proderj.rj.gov.br/inea\\_imagens/downloads/pesquisas/APA\\_Mangaratiba/Dantas\\_etal\\_2005.pdf](http://arquivos.proderj.rj.gov.br/inea_imagens/downloads/pesquisas/APA_Mangaratiba/Dantas_etal_2005.pdf)>. Acesso em 12/10/19. 2005.

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

DANTAS-TORRES, F. OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group tick. **Veterinary Parasitology**. v. 208, p. 9-13. 2015.

DAVOUST, B. Canine Ehrlichiosis. **Point Vét**, v.25, n. 151, p. 43-51; 1993

DE CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**. v. 119, p. 73-86. 2004.

DE LA FUENTE, J et al. Overview: Ticks as vectors of pathogens that can cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**. v. 13, p. 6938-46. 2008

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. **Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie Institut Pasteur d'Algérie** 15, 142–187. 1935.

DOYLE, C. K. et al. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**. v. 7, n. 4, p. 504-510. 2005.

EDWARDS, K. T.; GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A.S. Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” Pictorial Dissection Guide. **Midsouth Entomologist**. v.2, p.28–39, 2009.

EWING, S. A.; BUCKNER, R. G. Manifestation of babesiosis, ehrlichiosis and combined infections in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 26, p. 815-828, 1965.

EWING, S. A.; ROBERSON, W. R.; BUCKNER, R. G.; HAYAT, C. S. A new strain of *Ehrlichia canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, p. 1771-1774, 1971.

FERNANDES, J.I. et al. Eficácia in vitro do nim (*Azadirachta indica*) no Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.32 (Supl.1), p. 64-68, 2010.

FERREIRA, M. R. A et al. Prevalência, fatores de risco e associações laboratoriais para erliquiose monocítica canina. **Enciclopédia Biosfera**. v. 8, n. 15, p. 1345-1356. 2012.

FOURIE, J. J. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Veterinary Parasitology**. v. 197, n. 3-4, p. 595-603. 2013.

GAL, A. et al. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week old dog. **Canadian Veterinary Journal**. v. 48, p. 619–622. 2007.

GANGULY, S.; MUKHOPADHAYAY, S. K. Tick-borne ehrlichiosis infection in human beings. *Journal of Vector-Borne Diseases*. v. 45, o. 273-280. 2008.

HALOS, L. et al. Defining the concept of “tick repellency” in veterinary medicine. **Parasitology**. v. 139, n. 4, p. 419–423. 2012.

HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **The Veterinary Record**. v. 141, p. 360-363. 1997.

HARRUS, S. et al. 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, p. 361-368. 2002.

HARRUS, S. et al. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria Mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n. 3, p. 459-463. 2011.

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

HILDEBRANDT, P. et al. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and immunity**. v. 7, n. 2, p. 265-271. 1973.

HILL, C. A. et al. Arthropod-borne diseases: vector control in genomics era. **Nature reviews microbiology**. v. 3, p. 262-268. 2005.

INSTITUTO PET BRASIL, 29 de julho de 2019. Mercado pet estima faturar R\$ 36,2 bilhões em 2019, alta de 5,4%. Disponível em: <<http://institutopetbrasil.com/sem-categoria/mercado-pet-estima-2019/>>. Acesso em: 12/10/2019.

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. 2017.

JESUS, E. F. R. Interface entre a climatologia e a epidemiologia: uma abordagem geográfica. **Geotextos**. v. 6, n. 2, p. 211-36. 2010.

KAMANI, J. et al. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 3. 2013.

KOCH, H. G. Seasonal incidence and attachment sites of ticks (Acari: Ixodidae) on domestic dogs in southeastern Oklahoma and northwestern Arkansas, USA. **Journal of Medical Entomology**. v. 10, p. 293-298.1982.

KOCH H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 75, p. 583-586, 1982.

KOCH, H.G.; TUCK, M. D. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 79, p. 11-14. 1986.

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

LABRUNA, M.B., et al., Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 8, n. 1, p. 146 – 156. 2016.

LACAZ, C. S. et. al. Introdução à geografia médica no Brasil. Editora Edgard Blücher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo. 1972.

LEUTENEGGER, C. M. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. **Veterinary Sciences Tomorrow**, v. 1, 2001.

LEVIN, M. L. et al. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**. v. 58. p. 51–68. 2012.

LOPES, M. T. et al. Impactos sócio-ambientais em edificações populares em app no bairro quitandinha - Petrópolis - RJ. X Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada. 2003. Disponível em: <<http://www.cibergeo.org/XSBGFA/eixo3/3.4/037/037.htm>>. Acesso em: 15/01/2020.

LOULY, C. C. B. et al. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brasil. **Ciência Rural**. v. 37, n. 2, p. 464-469. 2007.

LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/species/ehrlichia-canis>>. Acesso em: 15/01/2020.

MAFRA, C. et al. First report of Ehrlichia ewingii detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 15, n. 2, p. 55-56. 2009.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of Rhipicephalus and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.

MAPAS PARA COLORIR. **Mapa do Estado do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<https://www.mapasparacolorir.com.br/mapa-estado-rio-de-janeiro.php>>. Acesso em 23/11/2019.

MATEI, I. A. et al. Altitude-dependent prevalence of canine granulocytic anaplasmosis in Romania. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 17, n. 2, p. 147-151. 2017.

MATSUMOTO, K. et al. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v.5, p. 363–372. 2005

- MAVROMATIS, K. et al. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**. v. 188, p. 4015–4023. 2006.
- MEDLOCK, J. M. et. al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes Ricinus* ticks in Europe. **Parasite and Vectors**. v. 2, n. 6, p. 1. 2013.
- MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. Climatologia: noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: **Oficina Textos**, 2007.
- MMWR: **Morbidity and Mortality Weekly Report**. V. 37, n. 17 p. 270-277. 1988.
- MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta tropica**. v. 117, n. 1, p. 51-55. 2011.
- MORAES-FILHO, J. Competência vetorial de carrapatos do grupo *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil, Argentina e Uruguai para transmissão da bactéria *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina. **Tese de doutorado, Universidade de São Paulo**. 2013.
- MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**. v. 91, p. 197-204. 2003.
- NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**. v. 38, n. 3, p. 766-770. 2008.
- NAVA, S. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**. v. 208, n. 1-2, p. 2-8. 2015.
- NDIP, L. M. et al. *Ehrlichia* species in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Cameroon. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**. v. 7, n. 2, p. 221-227. 2007.



NEEL, S. H. Medical Support of the U.S. Army in Vietnam, 1965-1970. Department of the Army, Washington D.C. Cap. XII, p. 150-158. 1973.

NUTALL, P. A. Wonders of tick saliva. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2018.

NYINDO, M. et al. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**. v.41, p. 250-254. 1980.

OIE. Vector-borne diseases. 31 de outubro de 2017. Disponível em <<https://www.whoA.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em 12/10/2019.

OLIVEIRA, B. C. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) DNA in Tissues From *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks in Areas Endemic for Canine Monocytic Ehrlichiosis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**. 2019.

PAIVA, D. Desenvolvimento e avaliação de métodos moleculares para caracterização de espécies do gênero *Amblyomma* Kock, 1884 (Acari: Ixodidae). 2019. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Orientado por Douglas McIntosh. 2019.

PAULINO, P. G. et al. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 159, p. 135-142. 2018.

PELEG, O. et. al. Multiplex Real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary Parasitology**. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20674177/>>. Acesso em: 12/10/2019.

PEREZ, M. et al. Human Infection with *Ehrlichia Canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1078, n.1, p. 110–117.

RAJAPAKSHA, P. et al. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *The Analyst*. 2018. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/an/c8an01488d/unauth#!divAbstract>>. Acesso em: 20/01/2020.

RIKIHISA, Y., PERRY, B. D.; CORDES, D. O. Ultrastructural study of ehrlichial organisms in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever. ***Infection and Immunity***. v. 49, p. 505–512. 1985.

RIKIHISA, Y. et al. Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. ***Journal of Infectious Diseases***. v. 175, p. 210–213. 1997.

SANCHES, G. S. Comparação biológica, morfológica e molecular entre carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Tese de Doutorado. Universidade estadual paulista, Instituto de biociências de Rio Claro. 2013.

SILVA, V. L. D. D. Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose Canina. Dissertação Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVEIRA, J. A. G., PASSOS, L. M. F., & RIBEIRO, M. F. B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. ***Veterinary Parasitology***. v. 161, n. 3-4, p. 270-275. 2009.

SOBRAL, B. S. et. al. Variabilidade espaço-temporal e interanual da chuva no Estado do Rio de Janeiro. ***Revista Brasileira de Climatologia***, A. XIV, v. 22. p.281-301. 2018.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. ***Biology of Ticks***, 2ª edição. Oxford University Press, New York. 2014.

SOUZA, B. M. P. da S. et al. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 19, n. 2, p. 89-93. 2010.

STOCKHAM, S. L. et al. Experimental transmission of granulocytic ehrlichial organisms in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 19, n. 4, p.99-104. 1990.

SZABO, M. P. et. al. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 131-149r. 2005

TOPOGRAPHIC-MAP.COM. Rio de Janeiro, Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Região Sudeste, Brasil (-22.91101;-43.20937). Disponível em: <http://pt-br.topographic-map.com/places/Rio-de-Janeiro-7883764>. Acesso em: 15/01/2020.

VENZAL, J. M. et al. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. **Parasitologia Latinoamericana**. vol.62, n.1-2, p. 23-26. 2007.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 7, p. 1852-1855. 1997.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. V. 21, n. 1. p. 75-98

## ANEXO I

Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães domiciliados.

### Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Propriedade No \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana

Localidade: \_\_\_\_\_ Altitude: \_\_\_\_\_

Coord. Geográf.: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Pt de referência: \_\_\_\_\_

Temperatura ambiente: \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_

1)Tipo de residência: ( ) pau a pique ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) outros:

2)Há parasitismo por carrapatos em pessoas: ( ) sim ( ) não ( ) já ocorreu

3)Tipo de vegetação predominante: \_\_\_\_\_

4)Quantos cães possui em casa? \_\_\_\_\_

5)Pratica alguma ação para controle de carrapato? sim ( ) não ( ) Qual? \_\_\_\_\_

6)Leva o cão ao veterinário? sim ( ) não ( ) Qual a

7)Periodicidade? \_\_\_\_\_

8)Presença de outras espécies domésticas:

( ) gatos

( ) bovinos

( ) equinos

( ) outros: Quais?.....

9)Presença de animais silvestres:

( ) gambá

( ) roedores

( ) outros:Quais? \_\_\_\_\_

10) Proprietário informado sobre os riscos das doenças Transmitidas por Carrapatos?

11) O proprietário conhece alguma doença transmitida por carrapatos?

Qual? \_\_\_\_\_

12) Nunca ouviu falar ( ) Já ouviu falar ( ) Sabe da relação com o cão ( ) Sabe da relação com o carrapato ( )

13) Conhece algum sintoma ( ) sim ( ) não. Se sim,

qual? \_\_\_\_\_

14) Proprietário informado sobre os riscos dos carrapatos? ( ) sim ( ) não

Conhece o nome do vetor ( )

Conhece a forma de transmissão ( )

15) Conhece algum caso na localidade de “doença do carrapato” em humanos?

( ) sim ( ) não

Condição econômica (observacional): ( ) baixa ( ) média ( ) alta

16) Escolaridade:

( ) Nunca frequentou a escola Primário

( ) 1º grau incompleto

( ) 1º grau completo

( ) 2º grau incompleto

( ) 2º grau completo

( ) superior

17) Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? \_\_\_\_\_

18) Utiliza prod. inseticidas no ambiente? ( ) sim ( ) não

19) Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos? \_\_\_\_\_

20) Utiliza métodos físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

( ) sim ( ) não

21) Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos? \_\_\_\_\_

Outras obs relevantes:

---

---

---

---

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL No \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_ Propriedade No \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Rur ( ) Urb Localidade:

\_\_\_\_\_ Proprietário: \_\_\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea Raça:

\_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Peso estimado: \_\_\_\_\_

1)Animal Castrado? ( ) Sim ( ) Não

2)Animal nascido na propriedade? ( ) sim ( ) não Se não, de onde veio o animal? \_\_\_\_\_

3)Há qt tempo está com o animal? \_\_\_\_\_

4) Histórico de carrapatos antes: ( ) sim ( ) não

5)Histórico de carrapatos na vizinhança: ( ) sim ( ) não

6)Pêlo: ( ) curto ( ) médio ( ) longo

7)Escore: ( )caquético ( )magro ( )normal ( )obeso

8)Comportamento: ( ) triste ( ) ativo/normal ( ) agitado

9)Idade: ( ) <6 meses ( ) 6 meses a 2 anos ( ) 2 a 5 anos ( ) 5 a 10 anos ( ) > 10 anos

10)Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: ( ) sim ( ) não

Apresenta algum sintoma atualmente?

Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

11)Animal vive dentro da residência: ( ) sim ( ) não ( ) às vezes

12)Locais de acesso do animal: ( ) pastagens ( ) córregos ( ) matas ( ) ambiente urbano

13)Contato direto com outras sp animais: ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

Histórico de patologias

anteriores: \_\_\_\_\_

14)Animal teve “doença do carrapato” ? ( ) sim ( ) não qual?

\_\_\_\_\_

15) Como diagnosticou?  clinicamente  laboratorialmente  outras

16) Foi tratado?  sim  não

17) Lembra do tratamento? se sim, qual? \_\_\_\_\_

18) Fez uso de algum medicamento recente? Qual?

19) Tipo de alimentação:  comida  ração  ambos

Marca da ração \_\_\_\_\_

20) Tipo de comidas e petiscos que come:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

21) Possui água e comida à disposição o tempo todo?  sim  não

Se não come quantas vezes ao dia: \_\_\_\_\_

22) Vermifugação:  sim  não Há qto tempo? \_\_\_\_\_

23) Qual produto? \_\_\_\_\_

24) Critério para escolha:  indicação  balconista  veterinário  propaganda

25) Possui ectoparasitos?  sim  não

26) Quais e quantidade? (+)

pulgas \_\_\_\_\_

piolhos \_\_\_\_\_

sarnas \_\_\_\_\_

carrapatos \_\_\_\_\_ Fases: \_\_\_\_\_ espécies:

\_\_\_\_\_

27) Faz tratamento?  sim  não Qual produto? \_\_\_\_\_

28) Se não trata, qual motivo? \_\_\_\_\_

29) Critério para escolha do produto:

indicação

balconista

veterinário

propaganda

30) Hábito do animal?

sempre preso

preso de dia e solto à noite

solto

outros \_\_\_

31) Apresenta abrigo?  sim  não Tipo: \_\_\_\_\_

32) Tipo de ambiente do animal:

cimentado

de terra

gramado

outros

33) Freq de recolhimento e limpeza das fezes:

diariamente  2 a 3 x por sem

1 x por semana

Exame físico:

Temperatura: \_\_\_\_ Pulso: \_\_\_\_ FR: \_\_\_\_ FC: \_\_\_\_ TPC: \_\_\_\_ Turgor:

\_\_\_\_ Linfonodos: \_\_\_\_\_

Mucosa ocular:  hipocorada  normocorada  icterica  congesta

Mucosa oral:  hipocorada  normocorada  icterica  congesta

Outras alterações sanitárias atuais:

\_\_\_\_\_

Secreção ocular: \_\_\_\_\_

Distúrbios atuais de coagulação na pele:  petéquias  equimoses  outros: \_\_\_\_\_

Observações sobre a saúde do animal ao exame físico:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dermatopatias?  sim  não

Sinais de otite?  sim  não

Outros tipos de lesões: \_\_\_\_\_

não faz

Tem assistência Veterinária?  sim  não

Frequência?  a cada 6 meses  1 x por ano  só qd fica doente



Animal é vacinado? ( ) sim ( ) não Quais vacinas? \_\_\_\_\_

Banho: ( ) semanal ( ) quinzenal ( ) mensal ( ) outros

Usa produtos parasiticidas? ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

Outras obs relevantes:

\_\_\_\_\_

Condição de limpeza do ambiente do animal:

( ) ruim ( ) moderada ( ) satisfatória

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_ CPF/RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, telefone: \_\_\_\_\_ recebi explicações

sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando

estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães, autorizo a coleta de material

biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será preservada, que não

haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na

realização dos exames.

Em \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_

## ANEXO II

### **Protocolo de extração de DNA de órgãos de carrapatos – DNEasy Blood & Tissue Extraction Kit – Qiagen®**

1-Centrifugar o microtubo de 1,5 ml contendo o órgão com conservante a 12.000 RPM por 3 minutos. Retirar o conservante cuidadosamente com uma ponteira de 100 µl e descartar.

2-Adicionar 500 µl de PBS 1x, inverter de cinco a quinze vezes e centrifugar a 12.000 RPM por 3 minutos. Descartar o sobrenadante. Realizar este passo três vezes.

3-Adicionar 180 µl de Buffer ATL. Misturar no vórtex por 15 segundos. Adicionar 20 µl de Proteinase K, misturar por inversão e incubar no Thermomixer a 56° C durante duas horas.

4-Adicionar 200 µl de Buffer AL, misturar no vórtex e incubar no Thermomixer à 56° C durante dez minutos.

5-Adicionar 200 µl de etanol 100%, misturar no vórtex, verter p conteúdo do tubo em uma minicoluna (filtro de sílica com tubo coletor) e centrifugar a 8.000 RPM por 1 minuto. Descartar o tubo coletor e colocar a sílica em um novo tubo coletor.

6-Adicionar 500 µl de AW1 e centrifugar por um minuto a 8.000 RPM. Descartar o tubo coletor e colocar e sílica em um novo tubo coletor.

7-Adicionar 500 µl de AW2 e centrifugar durante 3 minutos a 14.000 RPM. Descartar o tubo coletor e colocar a sílica em um novo microtubo de 1,5 ml.

8-Adicionar 60 µl de Buffer AE a 56° C. Incubar em temperatura ambiente por um minuto. Centrifugar por dois minutos a 14.000 RPM. Congelar a -20° C até o uso.