

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

TESE

Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935) em cães do estado do Rio de Janeiro

Renata Lins da Costa

2018



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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935) EM CÃES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RENATA LINS DA COSTA

Sob a orientação do professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação do professor
Huarrisson Azevedo Santos

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

C834c Costa, Renata Lins da, 1985-
Caracterização molecular de Ehrlichia canis
(Donatien e Lestoquard, 1935) em cães do estado do
Rio de Janeiro. / Renata Lins da Costa. - 2018.
94 f.

Orientador: Carlos Luiz Massard.
Coorientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2018.

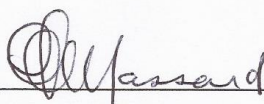
1. Filogenia. 2. Marcador molecular. 3. Erliquiose
canina. 4. Aspectos epidemiológicos. I. Massard,
Carlos Luiz , 1947-, orient. II. Santos, Huarrisson
Azevedo, 1981-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

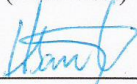
RENATA LINS DA COSTA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

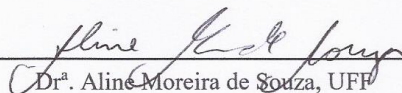
TESE APROVADA EM: 28/02/2018.



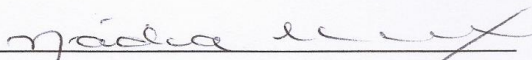
Dr. Carlos Luiz Massard, UFRRJ
(Orientador)



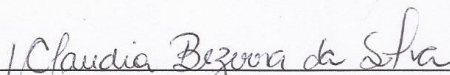
Dr. Huarrisson Azevedo Santos
(Co-Orientador)



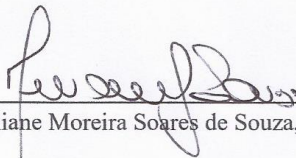
Dr.ª Aline Moreira de Souza, UFF



Dr.ª Nádia Regina Pereira Almosny, UFF



Dr.ª Claudia Bezerra da Silva, UFRRJ



Dr.ª Miliane Moreira Soares de Souza, UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese a Deus, por me guiar e me manter firme durante toda a execução deste trabalho. Aos meus pais Renê e Luzinete pelo incentivo, apoio e torcida, às irmãs Luciana e Fernanda por todas as palavras de incentivo. E aos cães, razão e meta de toda minha pesquisa.

*“Onde quer que haja mulheres e
homens, há sempre o que fazer, há
sempre o que ensinar, há sempre o que
aprender”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me manter perseverante e paciente para que trilhasse meu caminho com muita coragem.

Aos meus pais, Renê e Luzinete, pela vida, força e paciência por ter me ausentado em alguns momentos. Às minhas irmãs, Luciana e Fernanda pelo carinho e atenção. Às minhas sobrinhas Sofia e Olivia pelos momentos de descontração e ao meu cunhado Jorge Luis por todas as palavras de incentivo.

A todos meus familiares pelo incentivo incondicional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante o Doutorado, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard (DPA/IV/UFRRJ), pela confiança, magnífica orientação e por toda contribuição em minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos (DESP/IV/UFRRJ) por todo ensinamento acadêmico e pela excelente orientação.

Aos companheiros de laboratório (Laboratório de Hemoparasitos e Vetores – LHV/UFRRJ) Gabriela Lopes Vivas Vitari, Marcus Sandes Pires, Maristela Peckle Peixoto, Claudia Bezerra da Silva e Ana Paula Abreu Martinez por todos os ensinamentos profissionais e por estarem sempre atentos e dispostos a ajudar.

As companheiras de laboratório pertencentes ao LASAVE (Laboratório de Sanidade Avícola / UFRRJ): Patricia Paulino, Debora Martins, Tays Araújo, Roberta Tolomelli, Luisa de Oliveira, Thamyris Sampaio e Rodrigo Gredilha por ótimos momentos de descontração.

À Juliana Macedo Raimundo e Andresa Guimarães por estarem sempre dispostas a ajudar e pelos momentos de descontração.

Aos responsáveis pelas Organizações Não Governamentais e Laboratórios de Patologia clínica que gentilmente cederam as amostras.

Aos tutores dos animais, bem como os Médicos Veterinários Luiz Eckardt e Guilherme por estarem sempre dispostos a colaborar com as coletas.

Aos técnicos de laboratório Daniela Coelho, Josemar Gonçalves e Walter Flausino por toda ajuda com preparo de materiais e por vezes serem motoristas para os locais de coleta.

Aos animais, que sem eles, nenhuma pesquisa teria importância.

Obrigada a todos!

BIOGRAFIA

Renata Lins da Costa, filha de Renê Reis da Costa e Luzinete Ramos Lins da Costa, nasceu em 26 de julho de 1985, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental no Instituto de Educação Sarah Kubitschek (1992-1996), ginásio na Escola Municipal Amazonas (1997-2000) e ensino médio no Centro Interescolar Estadual Miécimo da Silva, em Campo Grande, Rio de Janeiro, concluindo em 2003.

No ano de 2006 ingressou na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação realizou estágios na área de clínica de pequenos animais na Clínica Cinco Estrelas em Campo Grande –RJ de janeiro a maio de 2007.

Atuou como bolsista Jovens Talentos II, Pré-iniciação-E FAPERJ, no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), trabalhando na área de maturação de oócitos de bovinos (2006-2007). De 2007 a 2008 atuou como bolsista de apoio acadêmico no Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal (LZNA), com ênfase na área de alimentação de ruminantes. Participou de projetos na área de zootecnia (LZNA) com ênfase em enriquecimento ambiental para suínos (2009-2010). Foi bolsista de extensão no Laboratório de Sanidade Animal (LSA), com ênfase na área de Microbiologia (2008-2011).

No ano de 2011, concluiu o curso de Medicina Veterinária.

Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado, área de concentração Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2012, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard, sendo contemplada com bolsa CAPES.

Concluiu o Mestrado no ano de 2014 e ingressou no Doutorado em março do mesmo ano. Ao longo do curso de doutorado, entre os anos de 2014 e 2017, desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho, e participou de alguns projetos do laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO GERAL

COSTA, Renata Lins da. **Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935) em cães do estado do Rio de Janeiro**. 2018. 91p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Os objetivos do presente estudo foram de caracterizar molecularmente *Ehrlichia canis*, utilizando os genes de glicoproteínas de membrana (*gp19*, *gp36*, *p28*) e o gene Fator de Alongamento termo instável (*tuf*) para caracterização gênica juntamente com o gene *16S rDNA* das amostras de sangue de cães naturalmente infectados, bem como avaliar a distribuição de *E. canis* e fatores associados em cães oriundos das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Foram testadas 267 amostras de sangue de cães do estado do Rio de Janeiro, pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com alvo em um fragmento de 93 pares de base (pb) do gene *16S rDNA* para a detecção de *E. canis*. Para realização da caracterização molecular, as amostras positivas nesta primeira análise foram testadas por PCRs convencionais para os genes *gp19* (414 pb), *gp36* (814 pb) e *p28* (840 pb). Uma amostra de cada mesorregião amplificada para os genes *gp19*, *gp36* e *p28* foram purificadas e sequenciadas, utilizando-se o método Sanger. Antes de avaliar a diversidade genética de *E. canis*, as amostras foram submetidas à detecção molecular por *16S rDNA*-qPCR. Foram coletadas 267 amostras de sangue de cães do estado do Rio de Janeiro. Entre as amostras analisadas, 42,3% (n = 113/267) foram positivas para qPCR para o gene *16S rDNA* de *E. canis*. O valor médio de C_q observado nas amostras positivas foi de 34,1 ± 5,1, variando entre 18 e 40 ciclos. O limite de detecção do qPCR foi de 10 cópias do plasmídeo por µL contendo um gene *16S rDNA* de *E. canis*. O coeficiente de determinação das sete diluições testadas na curva padrão foi de 99,9% e eficiência de 95,7%. Ao realizar PCR para os genes *gp19* e *gp36*, 100% (n=113/113) e 5,3% (n=6/113) das amostras foram positivas, respectivamente. As seis amostras positivas para PCR para o gene *16S rDNA* também amplificaram o gene *p28*. Apenas uma amostra PCR positiva para os três genes (*gp19*, *gp36* e *p28*) em cada uma das seis mesorregiões foi selecionada e submetida à análise de sequências de aminoácidos e nucleotídeos. A frequência em cada mesorregião para os 113 animais positivos para *E. canis*, pelo gene *16S rDNA*, foi de 59,29% (n=67/113) para mesorregião Metropolitana, 13,27% (n =15/113) para região Sul Fluminense, 15,04% (n=17/113) para mesorregião Norte Fluminense, 5,3% (n= 6/113) para mesorregião Centro Fluminense, 4,42% (n=5/113) na mesorregião Noroeste Fluminense e 2,65% (n= 3/113) na Baixada Litorânea. A caracterização baseada no gene *gp19* demonstrou que este gene é altamente conservado e as amostras apresentaram 100% de similaridade com as sequências brasileiros e mundiais disponíveis no GenBank. Utilizando o gene *gp36*, foi possível observar que há pontos polimórficos entre as sequências. Na análise de agrupamentos nota-se a formação de 3 clados, as sequências do presente estudo alocaram-se no genogrupo dos Estados Unidos, sugerindo similaridade genética entre as sequências brasileiras e norte-americanas. Na análise de proteínas, todas as amostras apresentaram sequências repetidas (“Tandem Repeat Sequence”), com 11 repetições. Foram observados sete sítios de aminoácidos de alta entropia, com variações de Hx: 0,5 a 0,67 gerando uma média de entropia de 0,6 detectados ao longo de TRP36, o que sugere um alto grau de polimorfismo. A razão das mutações não-silenciosas sobre as silenciosas, utilizando ambos genes mostrou diferenças genéticas significativas (p<0,05) entre as sequências do presente estudo demonstrando que há pressão de seleção positiva em ambos os genes analisados. As sequências *E. canis*-BaixLit e *E. canis*-Met apresentaram identidade de 100% e 99% para os genes *tuf* e *16S rDNA* quando comparados a sequência de referência Jake- EUA (CP000107) e Oklahoma- EUA (M73221), respectivamente. Tanto a análise do gene *16S rDNA* como no gene *tuf*, foi observado a

formação de dois Clados bem definidos, sendo o Clado A formado por amostras de *E. canis* e outras espécies do gênero *Ehrlichia* e o Clado B com outros organismos do gênero *Anaplasma*, com distância de 0,09 para o gene *16S rDNA* e 0,39 para o gene *tuf*, demonstrando a importância do gene *16S rDNA* na avaliação entre gêneros distintos. Foi observado que, a partir do diagnóstico citológico e do diagnóstico molecular (gene *gp19*) realizado no total de 267 amostras, 54,68% (n=146/267) apresentaram inclusões basofílicas sugestivas de parasitismo, e 43,80% (n=117/267) ocorreram amplificação de 414 pb do gene *gp19*, demonstrando discordância entre as técnicas (p=0,0004). Dentre os 117 animais em que foi detectado o DNA de *E. canis*, sendo o maior percentual (60,68%; n=71/117) nos cães da Mesorregião Metropolitana. A raça e sexo dos cães não apresentaram associação (p>0,05) com a positividade de *Ehrlichia canis* nas sequências analisadas. A investigação de diferenças gênicas nos isolados de *E. canis* torna-se útil para o entendimento e conhecimento da relação parasito-hospedeiro; além disso determinar a distribuição desta bactéria nos municípios avaliados torna-se vantajoso para a atualização da cadeia epidemiológica da erliquiose canina.

Palavras-chave: Erliquiose canina; marcador molecular; filogenia; aspectos epidemiológicos.

GENERAL ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. **Molecular characterization of *Ehrlichia canis* (Donatien and Lestoquard, 1935) in dogs from the state of Rio de Janeiro.** 2018. 91p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The aim of the present study was to characterize molecularly *Ehrlichia canis* using the membrane glycoprotein genes involved in the host parasite interaction (*gp19*, *gp36*, and *p28*), and also, the thermo unstable elongation factor (*tuf*) gene for characterization together with the *16S rDNA* gene from dog blood samples, as well as to evaluate the distribution of *E. canis* in dogs from the mesoregions of Rio de Janeiro state. 267 blood samples from dogs from the state of Rio de Janeiro were obtained and tested by the Real-Time PCR (qPCR) targeting a fragment of 93 base pairs (bp) of *16S rDNA* gene as a screening method for detection of the positive samples. Before evaluating the genetic diversity of *E. canis*, the samples were submitted to the molecular detection by *16S rDNA*-qPCR. A total of 267 blood samples of dogs from the state of Rio de Janeiro were collected. Among the samples analyzed, 42.3% (n=113/267) were qPCR positive for *16S rDNA* gene of *E. canis*. The average value of Cq observed in positive samples was $34,1 \pm 5,1$, ranging between 18 to 40 cycles. The detection limit of the qPCR was 10 copies of the plasmid per μL containing a *16S rDNA* gene from *E. canis*. The determination coefficient of the seven dilutions tested in the standard curve was 99.9% and efficiency de 95.7%. When performing *gp19*-PCR and *gp36*-PCR, 100% (n=113/113) and 5.3% (n=6/113) of the samples were positive, respectively. The six PCR positive samples for the *16S rDNA* gene also amplified the *p28* gene. Only one PCR positive sample for the three genes (*gp19*, *gp36* and *p28*) in each of the six mesoregions were selected and subjected to analysis of amino acid and nucleotide sequences. The frequency in each mesoregion for the 113 animals positive for *E. canis*, by the *16S rDNA* gene, was 59,29% (n=67/113) belonged to Metropolitan mesoregion, 13.27% (n=15/113) to South Fluminense, 15.04% (n=17/113) to Northern Fluminense, 5.3% (n=6/113) Center Fluminense, 4.42% (n=5/113) to Northwest Fluminense and 2.65% (n=3/113) to Coastal Baixada. The characterization based on the *gp19* gene demonstrated that this gene is highly conserved and the samples showed 100% similarity with the Brazilian and worldwide isolates available in GenBank. Using the *gp36* gene, it was possible to observe that there are polymorphic points between the sequences. Cluster analysis shows the formation of 3 clades, the sequences of the present study were allocated to the genogroup of the United States, suggesting a genetic similarity between the Brazilian and North American strains. In the protein analysis, all the samples presented repeated sequences (Tandem Repeat Sequences), with 11 replicates. Seven high entropy amino acid sites were observed, with variations of Hx: 0.5 to 0.67 generating mean entropy of 0.6 detected along the TRP36, suggesting a high degree of polymorphism. The ratio of non-silent to silent mutations using both genes showed significant genetic differences ($p < 0.05$) among the isolates of the present study demonstrating that there was positive selection pressure in both genes analyzed. The molecular detection based on the *tuf* gene revealed that both samples from the Metropolitan and the Baixada Litorânea mesoregions that presented adequate amplification. In the optimization of the reaction we observed a detection limit of 100 copies for the *tuf* gene. In the molecular characterization, *E. canis*-BaixLit and *E. canis*-Met presented 100% and 99% identity for the *tuf* and *16S rDNA* genes when compared to the reference sequence Jake (CP000107) and Oklahoma (M73221), respectively. In the analysis of the *tuf* and *16S rDNA* genes, the Baixada Coastal sample presented 99% identity. Non-synonymy mutation reflected in the substitution of a Glutamic Acid (E) for a Lysine (K). In the *16S rDNA* and *tuf* genes analysis, we observed the formation of two well defined clades, where the A containing samples of *Ehrlichia* genus, and the B with

other organisms of the genus *Anaplasma* suggesting genetic distance (0,34 *tuf* gene and 0,09 to *16S rDNA*). To evaluate the distribution of *E. canis* in the mesoregions of Rio de Janeiro state, the cytological and molecular diagnosis was performed targeting the *gp19* gene. From 267 samples, 54.68% (n=146/267) presented basophilic inclusions in monocytes suggestive of parasitism in the cytological evaluation. In 43.80% of the analyzed samples (n=117/267) it was possible to observe the amplification for *gp19* gene, which demonstrated a disagreement between cytological and molecular technique results (p=0.0004). Among the 117 animals in which *E. canis* DNA was detected, 60.68% (n=71/117) belonged to Metropolitan mesoregion, 12.82% (n=15/117) to Fluminense South, 14.52% (n=17/117) to Northern Fluminense, 5.12% (n=6/117) Fluminense Center, 4.27% (n=5/117) to Fluminense Northwest and 2.56% (n=3/117) to Coastal Baixada. It was observed that race and gender had no association (p>0.05) with *E. canis* positivity. The investigation of gene differences in the isolates of *E. canis* becomes useful for understanding the parasite-host relationship; in addition, determining the distribution of this bacterium in the evaluated municipalities is advantageous for the updating of the epidemiological chain of canine ehrlichiosis.

Keywords: Canine ehrlichiosis; molecular marker; phylogeny; epidemiologic aspects.

LISTA DE ABREVIações

μL – Microlitro
DNA- Ácido Desoxirribonucléico
EDTA- Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EMC- Erliquiose Monocítica Canina
h - Hora
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mg - Miligrama
min - Minuto
mL – Mililitro
mM - Milimolar
 ηg - Nanogramas
pb- pares de base
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
rpm – Rotação por minuto
TRP- Sequências repetidas em Tandem
V – Volts
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
EUA: Estados Unidos da América
A: Adenina
Cq: cycle quantification
dUTP: desoxiuridina trifosfato
dTTP: desoxitimina trifosfato
FAM: 6-carboxifluoresceína
G: Guanina
GroESL: gene induzido por choque térmico
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LHV / E.E.P.P. W.O. Neitz: Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz
p: p-valor
p28: gene que codifica a proteína de superfície
gp19: glicoproteína de membrana
gp36: glicoproteína de membrana
tuf: Fator de alongamento tu
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
rRNA: ácido ribonucleico ribossomal
TAMRA: tetrametilrodamina
 $^{\circ}\text{C}$: Celsius

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Número de acesso das sequências depositadas no GenBank obtidas no presente estudo.....	16
Tabela 2	Diferenças de nucleotídeos nas sequências do gene parcial (<i>gp36</i>) entre as sequências de <i>Ehrlichia canis</i> disponíveis no presente estudo e a sequência de referência disponível no GenBank.....	21
Tabela 3.	Diferenças de aminoácidos na sequência parcial do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre sequências de <i>Ehrlichia canis</i> obtidos de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e sequências do Brasil depositados no GenBank.....	22
Tabela 4.	Diferenças de aminoácidos na sequência parcial do polipeptídeo deduzido a partir de P28 entre sequências de <i>Ehrlichia canis</i> obtidos de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.....	25
Tabela 5.	Mutações silenciosas e não silenciosas de sequências parciais do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre sequências de <i>Ehrlichia canis</i> obtidos de cães mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.....	27
Tabela 6.	Teste de seleção (teste Z) na análise das médias entre todos os pares de sequência dos genes <i>gp36</i> e <i>p28</i> de <i>Ehrlichia canis</i>	28

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Comparação da identidade entre as amostras de <i>Ehrlichia canis</i> obtidas no presente estudo e as disponíveis no GenBank amplificadas pelo <i>tuf</i>	49
Tabela 2.	Comparação da identidade entre as amostras de <i>Ehrlichia canis</i> obtidas no presente estudo e as disponíveis no GenBank amplificadas pelo gene <i>16S rDNA</i>	49
Tabela 3.	Diferenças de aminoácidos na sequência parcial do polipeptídeo deduzido a partir de TUF entre sequências de <i>Ehrlichia canis</i> obtidos de cães das mesorregiões de Baixada litorânea e Metropolitana localizadas no estado do Rio de Janeiro.....	52

CAPÍTULO III

Tabela 1.	Análise da discordância entre o teste citológico e PCR, comparando os resultados obtidos quando amostras de cães foram submetidas ao diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i> neste estudo.....	73
Tabela 2.	Relação de positividade das amostras oriundas de cães coletadas de março de 2014 a abril de 2017 das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.....	74
Tabela 3.	Análise das amostras negativas para <i>Ehrlichia canis</i> obtidas de amostras de sangue de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.....	74
Tabela 4.	Frequência de positividade de amostras de sangue de cães para <i>Ehrlichia canis</i> , através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em função do gênero, nas Mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.....	75
Tabela 5.	Frequência de positividade de amostras de sangue de cães para <i>Ehrlichia canis</i> , através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em função do tipo racial, nas Mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.....	75

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Localização geográfica das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, evidenciando as mesorregiões e bairros em que foram obtidas as amostras de sangue de cães..... 11
- Figura 2.** Dendograma obtido a partir da sequência do polipetídeo *gp36* de *Ehrlichia canis* deduzido a partir da sequência parcial do gene *gp36* das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendograma foi construído utilizando o método Neighbor-Joining. A sequência de *Ehrlichia chaffeensis* foi utilizada como um outgroup..... 23
- Figura 3.** Dendograma obtido a partir da sequência do polipetídeo P28 de *Ehrlichia canis* deduzido a partir da sequência parcial do gene *p28* das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendograma foi construído utilizando o método Neighbor-Joining. A sequência de *Ehrlichia chaffeensis* foi utilizada como um outgroup..... 24
- Figura 4.** Dendograma obtido a partir da sequência do polipetídeo P28 de *Ehrlichia canis* deduzido a partir da sequência parcial do gene *p28* de amostras obtidos de amostras de *Ehrlichia canis* detectadas em cães oriundos das mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro e organismos da ordem Rickettsiales obtido no GenBank..... 26
- Figura 5.** Gráficos de entropia dos aminoácidos. A) Aminoácidos TRP36 de *Ehrlichia canis*. B) Aminoácidos deduzidos do gene *p28* de *Ehrlichia canis*..... 27

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Região do genoma completo de *E. canis* que contém os aminoácidos produzidos pelo gene *tuf*..... 45
- Figura 2.** Dendograma de distintos organismos da família Anaplasmataceae e amostras de *Ehrlichia canis* isoladas de cães baseado na comparação de sequência do gene *tuf*. O número de acesso ao GenBank estão ao lado das sequências. O dendograma foi construído utilizando o método Máxima Verossimilhança e o número nos nós indicam um bootstrap de 1000 replicatas. *Wolbachia* sp. foi utilizada como outgroup..... 50

Figura 3.	Dendograma de <i>Ehrlichia canis</i> isoladas de cães baseado na comparação de sequência do gene <i>16S rDNA</i> . O número de acesso ao GenBank estão ao lado das sequências. O dendograma foi construído utilizando o método Máxima verossimilhança e o número nos nós com valores de Bootstrap usando 1000 replicatas. <i>Wolbachia</i> sp. foi utilizada como “outgroup”.....	50
Figura 4.	Gráfico de entropia do gene <i>16S rDNA</i> realizado com as espécies do gênero <i>Ehrlichia</i> . Gráfico plotado no programa BioEdit 6.....	52
Figura 5.	Gráfico de entropia do gene <i>tuf</i> realizado com as espécies do gênero <i>Ehrlichia</i> . Gráfico plotado no programa BioEdit 6.0.....	53

CAPÍTULO III

Figura 1.	Localização geográfica das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, evidenciando as mesorregiões em que foram obtidas as amostras de sangue de cães.....	69
Figura 2.	Gel de Agarose a 1,5% corado com Brometo de etídio contendo amostras de DNA negativas (L1-L3) e positivas (L4-L8) para um fragmento de 414 pb do gene <i>gp19</i> de <i>Ehrlichia canis</i> amplificados durante a PCR convencional. Ladder= Marcador molecular de 1kb (Invitrogen®); C+= Controle positivo.....	72
Figura 3.	Células contendo inclusões intracitoplasmáticas sugestivas de parasitismo por hemoparasitos. A) Inclusões basofílicas encontradas em plaquetas, durante avaliação de esfregaço sanguíneo (setas). B) Monócito ativado sugestivo de parasitismo por <i>E. canis</i> C) Célula do sistema fagocítico mononuclear contendo inclusão sugestiva de parasitismo por <i>Ehrlichia canis</i> . Coloração Giemsa, microscopia óptica, aumento de 1000X.....	73

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

- Quadro 1** Oligoiniciadores baseados nos genes *gp19*, *gp36* e *p28* para amplificação e seqüenciamento de *Ehrlichia canis* em amostras de sangue de cães, coletadas de março de 2014 a abril de 2017, das mesorregiões do Rio de Janeiro..... 14
- Quadro 2** Sequências de *Ehrlichia canis* dos genes *gp19*, *gp36* e *p28* obtidos no Genbank utilizados no presente estudo..... 17

CAPÍTULO II

- Quadro 1** Sequências de *Ehrlichia canis* dos genes *16S rDNA* e *tuf* usados na reconstrução filogenética do presente estudo disponíveis no GenBank..... 48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I Caracterização molecular de <i>Ehrlichia canis</i> através da análise dos genes <i>gp19</i>, <i>gp36</i> e <i>p28</i> em cães do estado do Rio De Janeiro.....	2
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Taxonomia.....	6
2.2 Agente Etiológico	6
2.3 Histórico	6
2.4 Cultivo em meios artificiais.....	6
2.5 Transmissão e Ciclo biológico	7
2.6 Manifestações clínicas	8
2.7 Caracterização molecular e Diversidade genética.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Local do estudo e coleta.....	11
3.2 Extração de DNA das amostras de sangue de cão.....	12
3.3 Triagem de amostras positivas para <i>Ehrlichia canis</i> por qPCR.....	12
3.4 Controle positivo.....	13
3.5 Amplificação e caracterização molecular de <i>Ehrlichia canis</i> utilizando os genes <i>gp19</i> , <i>gp36</i> e <i>p28</i>	13
3.6 Sequenciamento, Análise filogenética e Análise de Entropia das sequências.....	15
3.7 Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais.....	19
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Detecção do DNA de <i>Ehrlichia canis</i> em amostras de sangue cães.....	20
4.2 Análise do alinhamento das sequências de nucleotídeos e das sequências de amonoácidos.....	20
4.3 Análise de entropia das sequências de aminoácidos.....	26
4.4 Mutação e Pressão de seleção positiva (TesteZ).....	27
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÕES.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO II Análise molecular dos genes <i>16S rDNA</i> e Fator de alongamento termo-instável (<i>tuf</i>) presentes em <i>Ehrlichia canis</i> de cães, mesorregiões de Baixada Litorânea e Metropolitana, do estado do Rio de Janeiro.....	40
1 INTRODUÇÃO	42

2 REVISÃO DE LITERATURA	43
2.1 Diagnóstico molecular.....	43
2.2 Alvos gênicos para caracterização molecular de <i>Ehrlichia canis</i>	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Amostragem, manipulação das amostras e triagem por qPCR para <i>Ehrlichia canis</i>	46
3.2 Desenho do oligoiniciador com alvo no gene <i>tuf</i>	46
3.3 Caracterização molecular de <i>Ehrlichia canis</i> baseada nos genes <i>tuf</i> e <i>16S rDNA</i>	46
3.4 Sequenciamento, análise filogenética e análise de entropia das sequências e distância média entre os clados.....	47
4 RESULTADOS	49
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO III Avaliação citológica, molecular e análise dos fatores associados à presença de DNA de <i>Ehrlichia canis</i> em cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro	62
1INTRODUÇÃO	65
2 REVISÃO DE LITERATURA	66
2.1 Distribuição mundial.....	66
2.2 Distribuição de <i>Ehrlichia canis</i> no Brasil.....	66
2.3 Diagnóstico laboratorial.....	66
2.4 Outros hospedeiros mamíferos.....	67
2.5 Fatores associados a positividade de cães para <i>Ehrlichia canis</i>	68
3 MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1 Local do estudo e coleta.....	69
3.2 Análise citológica.....	70
3.3 Análise molecular.....	70
3.4 Obtenção de informações sobre gênero e raça dos animais.....	70
3.5 Análise estatística.....	71
4 RESULTADOS	72
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8 CONCLUSÕES GERAIS	88

ANEXOS	89
Anexo I Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.....	90
Anexo II Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado aos responsáveis visitados nas Organizações não-governamentais (Ongs), dos municípios de Barra do Piraí (mesorregião Sul Fluminense) e município de Três Rios (mesorregião Centro Fluminense) localizados no estado do Rio de Janeiro.....	91

INTRODUÇÃO GERAL

A família Anaplasmataceae é composta por bactérias pleomórficas gram-negativas, que são parasitos intracelulares obrigatórios e infectam células de defesa e plaquetas. Dentro desta família destacamos dois principais gêneros: *Ehrlichia* e *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). Dentro do gênero *Anaplasma*, destacamos os crescentes estudos no âmbito do diagnóstico que tem proporcionado o desenvolvimento de ferramentas cada vez mais específicas e sensíveis. Recentemente foi descrito *Anaplasma platys* pela primeira vez em cães de Cuba (SILVA et al., 2016). Já *Anaplasma phagocytophilum* teve a sua primeira detecção em cães naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro no ano de 2011 (SANTOS et al., 2011). O gênero *Ehrlichia* possui cinco espécies válidas: *Ehrlichia canis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935), *Ehrlichia ewingii* (ANDERSON et al., 1992), *Ehrlichia chaffeensis* (ANDERSON et al., 1992), *Ehrlichia muris* (WEN et al., 1995) e *Ehrlichia ruminantium* (COWDRY, 1925) DUMLER et al., 2001. *Ehrlichia canis* é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) e parasita principalmente células do sistema fagocítico mononuclear, apresentando grande importância na medicina veterinária. Hoje este é um dos principais agentes etiológicos de impotência para a clínica de pequenos animais. A transmissão de *E. canis* ocorre através de carrapatos (ninfas e adultos) da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), popularmente conhecido como carrapato marrom do cão. Esta bactéria apresenta distribuição mundial, desde países do continente americano até países dos continentes europeu e asiático (RODGER et al., 1989; HARRUS et al., 2011; KAMANI et al., 2013; AGUIAR et al., 2013; MITTAL et al., 2017). Em avaliações citológicas, a positividade para *E. canis* no estado do Rio de Janeiro pode variar de 4,8% a 65,5% (ACETTA et al., 2008), desde áreas rurais à urbanas. Em análises moleculares, estudos indicam positividade de 5 a 16% (MACIEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2014).

A caracterização molecular de estirpes bacterianas da espécie *E. canis* tem sido realizada baseada apenas no gene *16S rDNA*, no entanto, este gene é conservado e apresenta baixa taxa de variação genética entre sequências de diferentes regiões geográficas (OLIVE; BEAN, 1999). A diversidade gênica de *E. canis* no Brasil foi avaliada por Aguiar et al. (2013) determinaram, baseados na análise do gene *gp36*, a existência de dois genótipos de *E. canis*. Outros genes classificados como proteínas de membrana (*gp19* e *p28*) também estão sendo utilizados para tipificação gênica e antigênica. Estes genes estão diretamente envolvidos na relação parasito-hospedeiro e apresentam significativa taxa de conservação, o que torna fundamental a sua caracterização molecular, pois, podem ser extremamente úteis para o desenvolvimento de vacinas e novas ferramentas de diagnóstico (MCBRIDE et al., 2007; NAKAGHI et al., 2010; MCBRIDE et al., 2011). O gene *tuf* (*elongation factor- TU*) codifica o fator de alongamento procariótico. É uma proteína de subunidade única de 50 kDa e está envolvido na formação da cadeia peptídica sendo um componente essencial do genoma bacteriano (NEGRUTSKII et al., 1998). Ainda não há relatos na literatura a respeito de um ensaio de diagnóstico baseado no gene *tuf* para *Ehrlichia canis*, no entanto, a descrição para caracterização e alvo para diagnóstico de bactérias extracelulares, como *Lactobacillum*, *Bifidobacterium* (VENTURA et al., 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (PALMER et al., 2013) e *Acetobacter* (HUANG et al., 2014) foram descritos. A busca por novos alvos gênicos torna-se útil para o conhecimento das diferentes estirpes bacterianas, contribuindo para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico. Os objetivos do presente estudo foram de caracterizar *Ehrlichia canis*, utilizando os genes de glicoproteínas de membrana envolvidos na interação parasito-hospedeiro (*gp19*, *gp36*, *p28*), o gene Fator de alongamento termo instável (*tuf*) juntamente ao gene *16S rDNA*, além de avaliar a distribuição e os fatores associados desta bactéria em cães oriundos das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS GENES *gp19*, *gp36* e *p28* EMCÃES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

COSTA, Renata Lins. **Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* através da análise dos genes *gp19*, *gp36* e *p28* obtidos de cães do estado do Rio De Janeiro**. 2018. 33p. Tese (Doutora em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética, através dos genes *gp19*, *gp36* e *p28* de *Ehrlichia canis* presentes em cães naturalmente infectados das seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. As amostras foram obtidas dos cães por venopunção cefálica. Para o diagnóstico de *E. canis*, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi utilizada com o alvo em um fragmento de 93 pares de base (pb) do gene *16S rDNA*. Para realização da caracterização molecular, as amostras positivas nesta primeira análise foram testadas por PCRs convencionais para os genes *gp19* (414 pb), *gp36* (814 pb) e *p28* (840 pb). Uma amostra de cada mesorregião amplificada para os genes *gp19*, *gp36* e *p28* foram purificadas e sequenciadas, utilizando-se o método Sanger. Antes de avaliar a diversidade genética de *E. canis*, as amostras foram submetidas à detecção molecular por *16S rDNA*-qPCR. Foram coletadas 267 amostras de sangue de cães do estado do Rio de Janeiro. Entre as amostras analisadas, 42,3% (n = 113/267) foram positivas para qPCR para o gene *16S rDNA* de *E. canis*. O valor médio de Cq observado nas amostras positivas foi de $34,1 \pm 5,1$, variando entre 18 e 40 ciclos. O limite de detecção do qPCR foi de 10 cópias do plasmídeo por μL contendo um gene *16S rDNA* de *E. canis*. O coeficiente de determinação das sete diluições testadas na curva padrão foi de 99,9% e eficiência de 95,7%. Ao realizar PCR para os genes *gp19* e *gp36*, 100% (n=113/113) e 5,3% (n=6/113) das amostras foram positivas, respectivamente. As seis amostras positivas para PCR para o gene *16S rDNA* também amplificaram o gene *p28*. Apenas uma amostra PCR positiva para os três genes (*gp19*, *gp36* e *p28*) em cada uma das seis mesorregiões foi selecionada e submetida à análise de sequências de aminoácidos e nucleotídeos. A frequência em cada mesorregião para os 113 animais positivos para *E. canis*, pelo gene *16S rDNA*, foi de 59,29% (n=67/113) para mesorregião Metropolitana, 13,27% (n =15/113) para região Sul Fluminense, 15,04% (n=17/113) para mesorregião Norte Fluminense, 5,3% (n= 6/113) para mesorregião Centro Fluminense, 4,42% (n=5/113) na mesorregião Noroeste Fluminense e 2,65% (n= 3/113) na Baixada Litorânea. A caracterização baseada no gene *gp19* demonstrou que a região analisada das amostras sequenciadas é altamente conservada e que estas apresentaram 100% de similaridade com os isolados brasileiros e de outras regiões do mundo (GenBank). Contudo, a partir da análise do gene *gp36*, foi possível observar que há uma diversidade genética entre os isolados. Ambos foram agrupados no genogrupo dos Estados Unidos, sugerindo uma similaridade genética entre as cepas brasileira e norte-americana. Na análise de proteínas, todas as amostras apresentaram sequências de repetições em 11 pontos diferentes. Foram distribuídos sete sítios de aminoácidos de alta entropia ao longo de TRP36, sugerindo que existe polimorfismo significativo nesta região. A partir da presença de mutações não-silenciosas, utilizando o gene *p28*, foi observado pontos polimórficos importantes com 11 sítios de aminoácidos de alta entropia ao longo das sequências de P28. Existe uma pressão de seleção positiva em ambos os genes ($p < 0,05$). O conhecimento da diversidade genética é fundamental para o conhecimento das formas de adaptação da bactéria ao hospedeiro o que, por consequência determina a relação ecológica estabelecida entre eles.

Palavras-chave: Diversidade genética; marcadores moleculares; epítomos; erliquiose monocítica canina.

ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. **Molecular characterization of *Ehrlichia canis* using genes *gp19*, *gp36* and *p28*, from the dogs of Rio de Janeiro state.** 2018. 33p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The present study aimed to evaluate genetic diversity through analysis of the *gp19*, *gp36* and *p28* genes of *Ehrlichia canis* in naturally infected dogs from six mesoregions of the Rio de Janeiro state. Samples were obtained from the dogs by venipuncture cephalic. The *E. canis* diagnosis was conducted with a real-time polymerase chain reaction (qPCR) targeting a 93 base pairs (bp) of the *16S rDNA* gene. To evaluate the parasite genetic diversity, PCR was used targeting a fragment of 414 bp of *gp19* gene, an 814 bp fragment of *gp36* gene and an 840 bp fragment of the *p28* gene. 267 blood samples from dogs from the state of Rio de Janeiro were obtained and tested by the Real-Time PCR (qPCR) targeting a fragment of 93 base pairs (bp) of *16S rDNA* gene as a screening method for detection of the positive samples. Before evaluating the genetic diversity of *E. canis*, the samples were submitted to the molecular detection by *16S rDNA*-qPCR. A total of 267 blood samples of dogs from the state of Rio de Janeiro were collected. Among the samples analyzed, 42.3% (n=113/267) were qPCR positive for *16S rDNA* gene of *E. canis*. The average value of Cq observed in positive samples was $34,1 \pm 5,1$, ranging between 18 to 40 cycles. The detection limit of the qPCR was 10 copies of the plasmid per μL containing a *16S rDNA* gene from *E. canis*. The determination coefficient of the seven dilutions tested in the standard curve was 99.9% and efficiency de 95.7%. When performing *gp19*-PCR and *gp36*-PCR, 100% (n=113/113) and 5.3% (n=6/113) of the samples were positive, respectively. The six PCR positive samples for the *16S rDNA* gene also amplified the *p28* gene. Only one PCR positive sample for the three genes (*gp19*, *gp36* and *p28*) in each of the six mesoregions were selected and subjected to analysis of amino acid and nucleotide sequences. The frequency in each mesoregion for the 113 animals positive for *E. canis*, by the *16S rDNA* gene, was 59,29% (n=67/113) belonged to Metropolitan mesoregion, 13.27% (n=15/113) to South Fluminense, 15.04% (n=17/113) to Northern Fluminense, 5.3% (n=6/113) Center Fluminense, 4.42% (n=5/113) to Northwest Fluminense and 2.65% (n=3/113) to Coastal Baixada. The characterization based on the *gp19* gene demonstrated that this gene is highly conserved and the samples showed 100% similarity with the Brazilian and worldwide isolates available in GenBank. However, from the analysis of the *gp36* gene, it was possible to observe that there is a genetic diversity among the isolates. Both were grouped in the genogroup of the United States, suggesting a genetic similarity between the Brazilian and North American strains. In the protein analysis, all the samples presented sequences of repetitions in 11 different points. Seven high entropy amino acid sites were distributed throughout TRP36, suggesting that there is significant polymorphism in this region. From the presence of non-silent mutations using the *p28* gene, important polymorphic points were observed with 11 high entropy amino acid sites along the P28 sequences. There is a positive selection pressure in both genes ($p < 0.05$). The knowledge of the genetic diversity is fundamental for the knowledge of the forms of adaptation of the bacterium to the host which, consequently determines the ecological relation established between them.

Keywords: Genetic diversity; molecular markers; epitopes; Canine Monocytic Ehrlichiosis.

1 INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935) é uma bactéria intracelular obrigatória e o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC). Esse organismo é um parasita das células do sistema fagocítico mononuclear, que inclui principalmente monócitos, e pode causar alta morbidade em populações de cães susceptíveis (HUXSOLL et al., 1970). *Ehrlichia canis* apresenta ampla distribuição e este caráter cosmopolita está associado à disponibilidade do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l). No estado do Rio de Janeiro, a prevalência varia de 5 a 16% (MACIEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2014). No estado de São Paulo, a prevalência é de 27,6% (NAKAGHI et al., 2010); a frequência de cães com *E. canis* no Brasil pode chegar a 65% (AGUIAR et al., 2013). Em outros países, como Argentina, Índia, Nigéria e Irã, a porcentagem de cães positivos para *E. canis* varia de 5,8% a 22,9% (EIRAS et al., 2013; KAMANI et al., 2013; MAAZI et al., 2014; MITTAL et al., 2017). A sequência genética mais estudada é a subunidade 16S do DNA ribossomal (16S rDNA) (MURPHY et al., 1998; BANETH et al., 2008; CHEN et al., 2010). No entanto, trata-se de um gene conservado com uma identidade que varia de 99,4 a 100% na África do Sul, América do Norte, Ásia e Europa. Estudos com proteínas imunorreativas demonstraram que *E. canis* possui regiões de repetição seriada (TRP) em seu genoma. Essas glicoproteínas são imunorreativas e possuem antígenos específicos da espécie e estão intimamente relacionados à interação parasita-hospedeiro (CÁRDENAS et al., 2007; ZHANG et al., 2008). A glicoproteína de membrana de 36 kDa (TRP36) contém um epitopo de anticorpo principal na região de repetição seriada e tem sido associada a interações funcionais patógeno-hospedeiro, tais como adesão e internalização, nucleação de actina e evasão imune (DOYLE et al., 2005; MCBRIDE et al., 2011). Em algumas seqüências, essa variação é de 12 a 15 repetições (LONG et al., 2002; ZHANG et al., 2008). O gene que codifica a glicoproteína de membrana 19 kDa (*gp19*) é mais conservado e contém regiões de epítopo (ZHANG et al., 2008).

A proteína da superfície externa de 28 kDa (P28) é codificada por um locus multigênico, que possui pelo menos 22 alelos do gene p28 (p28-1 a p28-22) nos cromossomos de *E. canis* e *E. chaffeensis* (LONG et al., 2002). A proteína P28 recombinante mostrou-se eficaz no diagnóstico sorológico de *E. canis* (MCBRIDE; YU; WALKER, 1999). Além disso, o gene *p28* é conservado em todas as seqüências de *E. canis* da América do Norte, o que permite o desenvolvimento de antígenos vacinais (MCBRIDE et al., 2000). Seqüências brasileiras foram usadas para confirmar que existem diferenças genéticas com seqüências de *E. canis* de outras partes do mundo (ZHANG et al., 2008; AGUIAR et al., 2013). Existem poucas seqüências dos genes *gp19*, *gp36* e *p28* de *E. canis* disponíveis no banco de dados (GenBank), limitando o desempenho de uma análise robusta da diversidade genética. O presente estudo visa contribuir para a identificação de genótipos circulantes de *E. canis* no estado do Rio de Janeiro, melhorando a compreensão da cadeia epidemiológica no estado do Rio de Janeiro. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de *E. canis* utilizando os genes *gp19*, *gp36* e *p28* em amostras de sangue total de cães naturalmente infectados oriundos das seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia

Filo: Proteobacteria Garrity et al., 2005

Classe: Alphaproteobacteria Garrity et al., 2006

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

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

Gênero: *Ehrlichia* (Moshkovski, 1945)

Espécie: *Ehrlichia canis*

2.2 Agente etiológico

São bactérias pleomórficas gram-negativas, parasitos intracelulares obrigatórios, que infectam primariamente leucócitos (monócitos, macrófagos e granulócitos) de várias espécies de animais domésticos e silvestres (COHN, 2003). De acordo com Silva (2001) *Ehrlichia canis* mede 0,2-0,4 µm de diâmetro, sendo considerado um microorganismo pequeno. Apresentam-se como inclusões intracitoplasmáticas e podem aparecer juntas ou separadas em estruturas conhecidas como mórulas, que geralmente se formam no citoplasma de leucócitos. Apresenta-se envolvida por uma fina membrana externa rugosa. Possui apenas um cromossomo, circular, contendo 1.315.030 nucleotídeos (GenBank ID: CP000107.1).

2.3 Histórico

Ehrlichia canis foi descrita inicialmente como *Rickettsia canis* em 1935 na Argélia por Donatien e Lestoquard. Na ocasião, os autores observaram estruturas localizadas em células mononucleares circulantes em um cão da raça Pastor Alemão. Juntamente com o exame clínico do animal associaram as “estruturas” à doença, denominada como uma rickettsiose. Em 1945, por conter caracteres morfológicos e biológicos compatíveis com o gênero *Ehrlichia* foi renomeado para *Ehrlichia canis* por Mashkovsky em homenagem a Paul Ehrlich, bacteriologista alemão (RISTIC et al., 1984). Entre as décadas de 40 e 50 alguns relatos da doença foram surgindo em países como África e Índia (EWING, 1969). Porém, como apenas na década de 60 é que a doença ganha destaque quando acomete 300 cães do exército americano na guerra do Vietnã. A doença incomum caracterizou-se por hemorragia, edema severo e alta mortalidade. Inicialmente, pensava-se em envenenamento, porém posteriormente os pesquisadores identificaram a bactéria em células de defesa nos cães acometidos (HUXSOLL et al., 1970).

No Brasil, em 1973, Costa e colaboradores relataram o primeiro caso de erliquiose em Belo Horizonte, Minas Gerais. Na ocasião, os autores identificaram inclusões (mórulas) em células de defesa em um cão naturalmente infectado. No Rio de Janeiro, Carrilo et al. (1976) relataram a ocorrência da doença em cães da Polícia Militar no Regimento de Olaria. Desta data em diante a EMC se tornou a principal patologia identificada e tratada em clínicas veterinárias dos estados do Sudeste, Sul, Centro-oeste e Nordeste do Brasil, ocorrendo maior prevalência na região nordeste onde se obteve 43% dos animais soropositivos (LABARTHE et al., 2003).

2.4 Cultivo em meios artificiais

O cultivo de *E. canis* em meios artificiais está sendo amplamente utilizado, principalmente para análise da diversidade gênica e antigênica presente nas diferentes

sequências. Zhang et al. (2008) demonstraram, a partir de *E. canis* cultivada em DH82 (“dog histiocytosis”), que sequências dos Estados Unidos e Brasil não apresentam divergências nas regiões de repetição em Tandem (consideradas regiões importantes para a interação parasito-hospedeiro), enquanto que na sequência de Israel foi possível observar diferenças de 12 a 15 repetições. Estes resultados demonstram que sequências dos EUA e Brasil são oriundos de um mesmo ancestral em comum e que a sequência de Israel pode ter origem em outra região geográfica.

A linhagem celular DH82 é a principal utilizada para o crescimento de *E. canis*. Esta linhagem foi obtida a partir de um cão com histiocitoma. Estas são consideradas células ideais para crescimento de bactérias intracelulares. A partir deste primeiro cultivo, várias outras sequências de *E. canis* foram cultivadas *in vitro* e geneticamente caracterizadas na América do Norte e no Velho Mundo. Na América Latina o isolamento *in vitro* de *E. canis* tem sido reportado no Brasil e Venezuela (WELLMAN et al., 1988; UNVER et al., 2001; TORRES et al., 2002; AGUIAR et al., 2007; 2008). Para realizar o cultivo é necessário submeter a amostra sanguínea infectada por *E. canis* a soluções específicas afim de separar os leucócitos (ZWEYGARTH et al., 2014), e após lavagens e remoção de eritrócitos presentes, as células de interesse podem ser inoculadas em monocamadas de células DH82 repicadas três dias antes e mantidas a 37°C a 5% de CO₂. Para o crescimento e a manutenção celular, utiliza-se o meio Dulbecco’s Modified Eagle’s (Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro de bezerro (Bovine Calf Serum – BCS; Hyclone®), renovado parcialmente a cada 3-4 dias. A monocamada inoculada é acompanhada após a segunda semana, a cada 5-6 dias, por exames citológicos e por PCR para confirmação da infecção. Deve-se manter as células infectadas em cultivo até que se apresente um mínimo de 50% de infecção. Procedimentos de passagens são feitos até que a monocamada apresente de 90 a 100% de infecção dentro de poucos dias após a inoculação (AGUIAR et al., 2007).

Ehrlichia canis também já foi obtida a partir de cultivo em outras linhagens celulares como macrófagos peritoneais de cão, células endoteliais de humanos, células de macrófago de rato e células embrionárias de carrapato (STENPHESON et al., 1977; DAWSON et al., 1993; KEYSARY et al., 2001; ZWEYGARTH et al., 2014).

2.5 Transmissão e Ciclo biológico

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato é o principal vetor da EMC. Segundo Woody e Hoskins (1991) o carrapato se infecta a partir do repasto sanguíneo, ingere células contendo mórulas de *E. canis*. Esta infecção permanece localizada no intestino médio e nas glândulas salivares do ixodídeo. A reação inflamatória causada no local da picada favorece o deslocamento desses leucócitos, o que facilita a disseminação da bactéria no hospedeiro vertebrado. A transmissão do cão para o carrapato ocorre entre as primeiras 2 a 3 semanas de infecção no cão, uma vez que os leucócitos infectados são mais prevalentes durante os estágios iniciais da infecção. Uma vez infectado, o carrapato transmite a bactéria de forma transestadial, e neste caso, tanto ninfa como adulto podem transmitir *E. canis* a qualquer momento por um período de pelo menos 155 dias (GROVES et al., 1975; WOODY; HOSKINS, 1991). A frequência de *R. sanguineus* encontrados naturalmente infectados por *E. canis* varia de 2,3 a 6,2% (AGUIAR et al., 2007) e devido a seu hábito nidícola é encontrado preferencialmente em regiões urbanas do país (LABRUNA et al., 2001).

No hospedeiro vertebrado, os monócitos fagocitam a bactéria. Após a fagocitose, dentro dos monócitos, a bactéria penetra nos vacúolos do citoplasma ocorrendo a formação dos corpúsculos elementares, estes corpúsculos evoluem para corpúsculos iniciais (estruturas esféricas de 1 a 2µm) e após sete dias, os corpúsculos iniciais, realizam divisão binária dando origem a novos corpúsculos elementares. O conjunto de corpúsculos elementares dá origem às

mórulas (GREGORY; FORRESTER 1990; DAVOUST, 1993). O corpúsculo inicial é menos evidente que a mórula e os corpúsculos elementares são facilmente identificáveis quando a mesma mórula deixa a célula parasitada por lise ou exocitose (EWING, 1969).

Em condições experimentais demonstrou-se, através de PCR, que ninfas alimentadas em cães infectados, quando evoluíram para adultos machos, estes, na ausência de fêmeas, eram capazes de transmitir a bactéria no momento do repasto sanguíneo (BREMER et al., 2005). Outro fato que deve ser destacado na gênese do ciclo é a ausência da transmissão transovariana (BAKEN; DUMLER, 2015). Sabe-se que larvas de *R. sanguineus* não atuam na transmissão, no entanto, podem se infectar pelo agente e esta infecção se manter nos estágios de ninfa e adulto (BREMER et al., 2005).

A participação de outros gêneros na transmissão de *E. canis* já foi estudada, porém o papel deles na transmissão natural de *E. canis* continua sem relatos. Uma espécie da família Argasidae, *Otobius megnini*, foi infectado experimentalmente por *E. canis*, porém não foi capaz de atuar como vetor da bactéria (EWING et al., 1990). Já com *Dermacentor variabilis* foi possível comprovar que este carrapato apresenta boa capacidade de transmissão. Em infecção experimental conduzida por Johnson et al. (1998), eles determinaram a transmissão transtadial quando observaram mórulas de *E. canis* em sangue periférico dos cães desafiados, além disso, ocorreu soroconversão dos animais 30 dias após exposição e os mesmos apresentaram sinais clínicos, como secreção ocular mucopurulenta, linfadenopatia e pirexia.

2.6 Manifestações clínicas

O período de incubação é de 8 a 20 dias. A bactéria ao infectar o hospedeiro vertebrado multiplica-se, por fissão binária, em macrófagos do sistema mononuclear fagocitário. Em seguida, ocorre liberação por exocitose e a bactéria dissemina para órgãos como baço, fígado e linfonodos. Nesta fase também ocorre trombocitopenia entre 10 a 20 dias após infecção, além de ocorrer aumento no número de plaquetas imaturas. Esta fase é caracterizada como aguda e tem duração de duas a quatro semanas (GREENE, 2006). Os principais sinais clínicos são: apatia, anorexia, vômito, secreção óculo-nasal, esplenomegalia, mucosas pálidas, petéquias, epistaxe e uveíte (NAKAGHI et al., 2008; BORIN et al., 2009; HARRUS; WANER, 2011). Estes sinais clínicos tendem a diminuir progressivamente em uma a quatro semanas porém alguns animais tornam-se persistentemente infectados e entram na fase assintomática ou subclínica

Após seis a nove semanas da inoculação o animal infectado entra na fase subclínica. Nesta fase, animais que apresentam o sistema imune competente podem eliminar o parasito e cessar os sinais clínicos da doença, não chegando a entrar na fase crônica. A maior quantidade de *E. canis* é encontrada no baço, último órgão a ser parasitado antes de sua eliminação (BREITSCHWERDT, 2004). Durante esta fase, os animais apresentam-se clinicamente saudáveis, porém os que não conseguiram debelar a bactéria tornam-se potenciais portadores por anos.

A fase crônica só ocorrerá em animais que não eliminaram o agente durante a fase subclínica e caracteriza-se por sangramentos em mucosas e conjuntivas e supressão medular refletindo em uma pancitopenia severa, o que geralmente leva o animal ao óbito (DAGNONE et al., 2001). Os sinais clínicos são palidez das mucosas, fraqueza, sangramento e perda de peso significativa, muito semelhante aos sinais da fase aguda, porém mais severos (HARRUS; WANER, 2011).

A patogenia da doença é afetada pela quantidade do inóculo no momento do repasto sanguíneo além da patogenicidade das sequências, co-infecções e diagnóstico preciso na fase aguda. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) ao inocular altas cargas de células

parasitadas pode também veicular outros agentes da família Anaplasmataceae e protozoários como *Hepatozoon canis* e *Babesia canis*, e estes fatores refletem em prognósticos desfavoráveis (HARRUS; WANER, 2011).

2.7 Caracterização molecular e Diversidade genética

Caracterizar um microorganismo molecularmente significa mensurar características herdáveis. Estas características devem ser expressas heterogeneamente em diferentes ambientes. Os métodos moleculares de caracterização revelam o polimorfismo nas sequências de DNA entre diferentes indivíduos e são conhecidos como marcadores moleculares. Os marcadores são ferramentas rápidas e eficazes para estudos genômicos, uma vez que detectam o polimorfismo no DNA sem influência ambiental (SOUSA, 2010). Com base nesse polimorfismo, é possível fazer inferências sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos. Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microssatélites, também denominadas SSR (“Simple Sequence Repeat”), são os preferidos para aplicações e estudos genéticos, principalmente devido a sua natureza multialélica, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (LI et al., 2002), além de necessitar de quantidades pequenas de DNA para dar início às reações (POWELL et al., 1996).

A diversidade genética de linhagens brasileiras de *E. canis* é conhecida, contudo os mecanismos responsáveis por essa diversidade ainda são desconhecidos (AGUIAR et al., 2013). O fato de esta diversidade ocorrer nos genes que codificam proteínas justificam o estudo genético das sequências. Essa análise visa investigar o controle da expressão gênica fornecendo informações sobre quais proteínas estão sendo expressos, qual o nível e o momento desta expressão, representando assim um elo entre o genótipo e o fenótipo de um organismo, fator essencial na elaboração de vacinas e/ou testes diagnósticos (SILVA, 2007). As principais proteínas imunodominantes de *E. canis* (19 a 200-kDa) tem sido caracterizadas em diferentes sequências (MCBRIDE et al., 1999; UNVER et al., 2001). Estes antígenos vêm apresentando diferentes graus de similaridade inclusive entre outras espécies de *Ehrlichia*, como é frequentemente observado em reações de Imunofluorescência, “Western Blotting” e sequência de aminoácidos. A proteína P28 de *E. canis* tem sido indicada como possível candidata para uma futura vacina em decorrência da alta antigenicidade e da alta similaridade entre diferentes sequências norte-americanos (MCBRIDE et al., 1999).

Análises de outras proteínas imunodominantes de sequências de três continentes apresentaram polimorfismo, principalmente na porção de repetição de aminoácidos da proteína TRP36 (“Sequências repetidas em Tandem” – proteínas com sequencias de repetições de aminoácidos). Essa diferença foi relatada numa sequência israelense (sequência Israel de *E. canis*) (ZHANG et al., 2008). Como TRP36 é um importante local de reconhecimento sorológico, essa diferença resultou numa alteração antigênica que não é reconhecida por anticorpos anti-TRP36 de sequências heterólogas (ZHANG et al., 2008). Além disso, a TRP36 está associada às interações patógeno-hospedeiro como adesão, internalização e evasão imune. Por isso a diversidade observada nesse fragmento pode ser relacionada a pressão imunológica sofrida provavelmente quando infecta diferentes espécies de hospedeiros (MCBRIDE; WALKER, 2011).

Outras pequenas diferenças foram notadas nas TRPs das proteínas TRP140 e Ank200. Por outro lado, avaliações moleculares da proteína TRP19 apresentaram o maior grau de conservação entre as diferentes sequências de *E. canis*, acreditando-se inclusive ser um potencial alvo vacinal por apresentar uma região rica em Serina-Treonina-Glutamato (STE-rich), local considerado um importante epítipo (ZHANG et al., 2008; MCBRIDE et al., 2007). *Ehrlichia canis* se alimenta principalmente de glutamato, o glutamato ajuda na fixação

do nitrogênio o que prejudica a síntese de proteínas. O fato de esta proteína estar presente fora da mórula, no citoplasma e no núcleo celular, sugere que a TRP19 está diretamente envolvida na interação parasito-hospedeiro durante a infecção (MCBRIDE et al., 2007). As glicoproteínas como TRP19 e TRP36, estão relacionadas a resposta imunológica aguda e também tem sido amplamente estudadas e utilizadas para identificar as diferentes variantes dentro da espécie *E. canis* (CÁRDENAS et al., 2007).

Diversas amostras de *E. canis* foram avaliadas pelo sequenciamento de nucleotídeos dos genes *16S rDNA*, *dsb* e *gp36*. Segundo análise do gene *dsb* e *16S rDNA*, as sequências americanas foram idênticas às sequências de *E. canis* disponíveis no GenBank, como já esperado pois estes genes são altamente conservados (MURPHY et al., 1998; DOYLE et al., 2005). As análises do gene *gp36* revelaram a presença de dois genogrupos distintos de *E. canis* circulando no Brasil, baseado na sequência de repetição de aminoácidos (“Repeat Proteins”) (AGUIAR et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo e coleta

O estudo foi realizado de março de 2014 a abril de 2017. Foram coletadas 267 amostras de sangue total obtidas de cães naturalmente infectados das seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Estas mesorregiões são classificadas, segundo IBGE (2010), como: Metropolitana (Met), Norte Fluminense (NorFlu), Noroeste Fluminense (NoroFlu), Baixada Litorânea (BaixLit), Centro Fluminense (CenFlu) e Sul Fluminense (SulFlu). As amostras das quatro primeiras regiões foram obtidas de parcerias com laboratórios de Patologia Clínica e das regiões Centro e Sul Fluminense obtido de Organizações Não-Governamentais (Ongs) (Figura 1).

As amostras obtidas dos laboratórios de patologia clínica foram selecionadas, baseadas em informações disponíveis na ficha cadastral. Os bairros foram selecionados de forma a realizar a coleta em cada mesorregião de interesse.

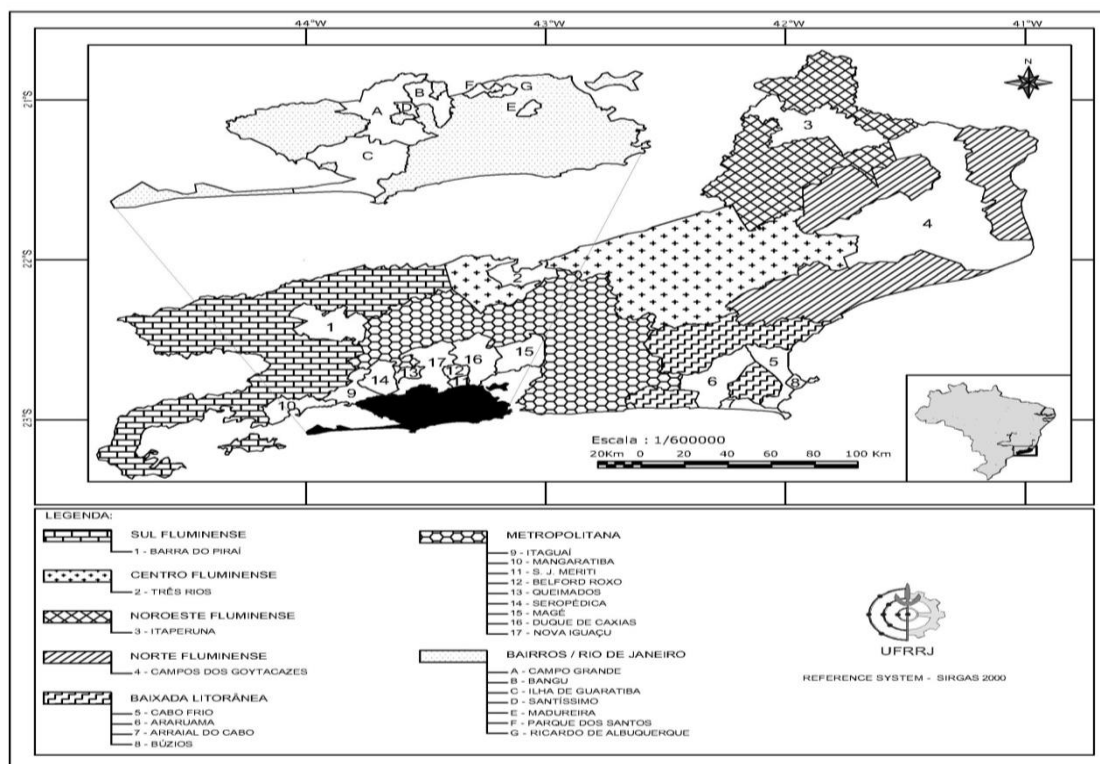


Figura 1. Localização geográfica das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, evidenciando as mesorregiões e bairros em que foram obtidas as amostras de sangue de cães.

Para a determinação do tamanho da amostra de cães foi estabelecido o grau de confiança de 95%, prevalência esperada de 16% (MACIEIRA et al., 2005) e margem de erro de 5% número mínimo de amostras de cães nas mesorregiões foi de 206 amostras, segundo a equação descrita por Sampaio (2002). A amostragem foi realizada de forma não probabilística. Foram coletados 3mL de sangue por venopunção cefálica de cada animal, e em seguida alocados em tubos contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), armazenados em recipiente refrigerado e transportado ao Laboratório de

Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para posterior análise.

3.2 Extração de DNA das amostras de sangue de cão

A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizada com kit comercial (WizardGenomic DNA Purification Kit - Promega®) a partir de 300 µL de sangue total, seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop2000®) e em seguida foram alíquotadas na concentração de 100ng/µL. As alíquotas foram congeladas em freezer -20°C até o momento das análises moleculares.

3.3 Amostras positivas para *Ehrlichia canis* por qPCR

Foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) visando a amplificação de um fragmento de 93 pb do gene *16S rDNA*. Este ensaio foi realizado com o objetivo de realizar uma triagem das amostras positivas para *E. canis* de acordo com a reação descrita por Baneth et al. (2008). No presente estudo, As características da qPCR foram avaliadas de acordo com as recomendações de Bustin et al. (2009). A sensibilidade analítica da qPCR foi avaliada usando diluições decimais em série do amplicon clonado em um plasmídeo. A concentrao do DNA plasmidial foi verificada utilizando fluorimetria (Qubit TM, ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA). O número de cópias do plasmídeo versus os valores de Cq foram plotados para determinar a sensibilidade analítica do qPCR. O número de cópias variou de 1 a 1×10^6 por µL, com sete séries de diluição separadas para cada ponto da curva em triplicata. A regressão linear, juntamente com o coeficiente R² obtido após a determinação de cada ponto da curva, pode ser usada para avaliar a otimização da qPCR. A eficiência de cada reação foi determinada usando a seguinte fórmula: [Eficiência = 10 (-1 / slope) - 1] (SVEC et al., 2015).

A especificidade do ensaio foi avaliada usando DNA de *Anaplasma phagocytophilum* obtido a partir de culturas celulares; *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* obtidas de amostras de sangue de cães naturalmente infectados com alta parasitemia, em fase aguda, com infecção diagnosticada por microscopia e confirmada por ensaio molecular específico.

Os Oligoiniciadores utilizados foram: EHR16S F-5'-TATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTGTTA'3 e R-5'-ACCATTTCTAATGGCTATTCCGTACTA'3, a sonda 5'-FAM TGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGG-TAMRA-3' marcada com "reporter dye" FAM na extremidade 5' e o "quencher" TAMRA na extremidade 3'. O volume final da reação foi de 12 µL contendo: 6 µL TaqMan® (1X), 0,3 µM de cada primer, 0,2 µM de sonda e 100 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 2 minutos a 50 °C, desnaturação em 10 minutos a 95 °C e 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento-extensão a 60 °C por 1 minuto (BANETH et al., 2008). A reação foi realizada usando o instrumento de PCR em Tempo Real Step One Plus® (Applied Biosystems). O "Threshold" foi padronizado entre as placas e foram atribuídos manualmente três ciclos após a fluorescência de base. As amostras que apresentaram o ciclo de quantificação (Cq) menor ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas.

3.4 Controle positivo e negativo

Para controle positivo foi utilizada amostra de sangue um cão naturalmente infectado, que apresentou no exame citológico, a presença de mórulas em monócitos e PCR positiva, após análise do DNA. A amostra foi amplificada, utilizando o gene *gp19* com alvo em 414pb (CHEN et al., 2010).

Água livre de Nuclease (Ambion®) foi usada como controle negativo. A amostra foi sequenciada pelo método Sanger, posteriormente depositada no “GenBank” ID: MG584542. A concentração do DNA foi verificada utilizando fluorômetro (Qubit dsDNA HS- Thermo Fisher Scientific®). A concentração serviu como ponto de partida para a obtenção da quantidade de moléculas por microlitro, seguindo a fórmula descrita abaixo:

$$\text{Número de cópias} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{cópias por mol}) \times \text{Concentração de DNA (g)}}{\text{tamanho do alvo (pares de base)} \times 660 (\text{g/mol/bp})}$$

Como controle positivo nas reações de PCR foi utilizada a penúltima diluição do limite de detecção.

3.5 Amplificação e caracterização molecular de *Ehrlichia canis* utilizando os genes *gp19*, *gp36* e *p28*

Para a realização da caracterização molecular utilizou-se uma amostra positiva de cada mesorregião (Met, SulFlu, NorFlu, NoroFlu, BaixLit e CenFlu). Foram utilizados oligoiniciadores específicos para *E. canis* com alvos no gene *p28* para amplificar 843 pb, gene *gp19* com 414 pb e gene *gp36* com 840 pb. As condições das reações de PCR e a sequência dos oligoiniciadores utilizados estão listados no quadro 1. Controle positivo e negativo foi obtidos conforme descrito na seção secundária 3.4. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de Agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi de 60 minutos a 70 volts (SV/cm), em seguida os géis foram corados com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação (E-Gel Imager- Life Technologies®).

Quadro 1. Oligoiniciadores baseados nos genes *gp19*, *gp36* e *p28* para amplificação e seqüenciamento de *Ehrlichia canis* em amostras de sangue de cães, coletadas de março de 2014 a abril de 2017, das mesorregiões do Rio de Janeiro

Gene	Oligoiniciadores	Tamanho (pb)	Reagentes	Termociclagem	Referência
<i>gp19</i>	F 5'-ATTAGTGTGTTGGTTATGCAA-3' R 5'-TACGCTTGCTGAATATCATGA-3'	414pb	Buffer: 1x MgCl ₂ :2,5mM dNTPs:0,2mM Primers:0,6µM (each) Taq:0,125U DNA:5µl Vf:25µl	94°C:3min 35ciclos: 94°C:1min; 55°C:1min; 72°C:1,5min; 72°C:5min	Chen et al., 2010
<i>p28</i>	F 5'-ATGAATTGCAAAAAAATTCTTATA-3' R 5'-TTAGAAGTTAAATCTTCCTCC -3'	843pb	Buffer: 1x MgCl ₂ :2,5mM dNTPs:0,2mM Primers:0,6µM (each) Taq:1,2U DNA:5µl Vf:25µl	95°C:5min 30ciclos: 95°C: 30seg; 55°C:1min; 72°C:2min; 72°C:5min.	Nakaghi et al.,2010
<i>gp36</i>	F 5'-GTATGTTTCTTTTATATCATGGC-3' R 5'-GGTTATATTTTCAGTTATCAGAAG-3'	840pb	Buffer: 1x MgCl ₂ :2,5mM dNTPs:0,2mM Primers:0,6µM (each) Taq:0,125U DNA:5µl Vf:25µl	94°C:3min 35ciclos: 94°C:1min; 55°C:1min; 72°C:1,5min; 72°C:5min	Chen et al., 2010

3.6 Sequenciamento, Análise filogenética e Análise de Entropia das sequências

Os produtos da PCR com alvo nos genes *gp19*, *gp36* e *p28* foram purificados utilizando o kit Clean Sweep PCR Purification (Thermo Fisher Scientific®) conforme recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram sequenciadas pelo método de Sanger (SANGER et. al., 1997) no equipamento ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems®). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em ambas as direções utilizando os oligoiniciadores descritos no quadro 1. As sequências foram montadas e editadas utilizando o programa CLC Genomics WorkBench v8.0 (POSADA; CRANDALL, 1998) e foram depositadas no GenBank sob números de acesso descritos na tabela 1. A ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) foi usada para avaliar a identidade dos genes *p28*, *gp19* e *gp36* com sequências de nucleotídeos de *E. canis* disponíveis no GenBank.

As sequências obtidas neste estudo para o gene *gp19*, *gp36* e *p28* foram alinhadas com outras sequências de diversas partes do mundo para caracterização da diversidade genética das amostras de *E. canis* do Brasil. Todos os códigos de acesso e o país de origem das sequências dos genes *gp19*, *gp36* e *p28* utilizadas para o alinhamento estão listados no quadro 2. Os alinhamentos foram realizados utilizando o algoritmo Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Os agrupamentos filogenéticos de todas as sequências foram realizados utilizando o método de Máxima Verossimilhança. A sequência de referência para os genes *gp 36* e *gp 19* foi o sequência de Jake- Estados Unidos da América (DQ085427 e DQ858221 respectivamente) e o sequência de Jaboticabal (São Paulo- Brasil) EF014897. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para calcular a distância evolucionária. O modelo foi selecionado baseado em Akaike Information Criterion (AIC) utilizando o software jModelTest2 (DARRIBA et al., 2012). A combinação de clusters filogenéticos foi avaliada usando teste de Bootstrap com 1000 pseudo-réplicas para testar diferentes reconstruções filogenéticas.

Como *outgroup* na reconstrução dos genes *gp36* e *p28* foi utilizado *E. chaffeensis* (DQ85431, CP000236 e AF479833). Para estabelecer a especificidade que a proteína P28, deduzida a partir do gene *p28*, produz em *E. canis*, uma reconstrução filogenética com membros da ordem Rickettsiales e outra somente com *E. chaffeensis* foi realizada. Na reconstrução para membros da ordem Rickettsiales, *Neorickettsia risticii* (HQ906682) foi utilizada como *outgroup*. As sequências utilizadas para análise da especificidade estão descritas no quadro 2. A filogenia e as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de DNA foram transcritas e analisadas usando o programa CLC Main Workbench v.7.9.1.

Para entender o grau de variação dos genes *gp36* e *p28*, a entropia dos alinhamentos das sequências de aminoácidos foi calculada utilizando o software a BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL et al., 1999). Um valor de entropia maior que 0,4 sugere que determinado sítio não seja conservado (HE et al., 2008). Além da análise de entropia foram utilizados testes de seleção positiva baseados em códons (Z-test) para estimar o número de substituições sinônimas e não-sinônimas por sítio (razão dN/dS) dos aminoácidos das proteínas TRP36 e P28 para entender se essas proteínas são submetidas a uma seleção positiva ($p < 0,05$). Esta análise evolutiva foi realizada no programa Mega 7.0 utilizando o método (NEI; GOJOBORI, 1986).

Tabela 1. Número de acesso das sequências depositadas no GenBank obtidas de *Ehrlichia canis* oriundas de amostras de sangue de cães GenBank das mesorregiões do Rio de Janeiro, obtidas de março de 2014 a abril de 2017

Gene	Amostra	Número de acesso	Gene	Amostra	Número de acesso	Gene	Amostra	Número de acesso
<i>gp19</i>	Met	MG584539	<i>gp36</i>	SulFlu	MG584545	<i>p28</i>	Met	MG584550
	SulFlu	MG584540		NorFlu	MG584546		SulFlu	MG584551
	BaixLit	MG584541		BaixLit	MG584547		BaixLit	MG584552
	NorFlu	MG584542		Met	MG584548		CenFlu	MG584553
	NoroFlu	MG584543		NoroFlu	MG584549		NoroFlu	MG584554
CenFlu	MG584544				NorFlu	MG584556		

Met=Metropolitana; SulFlu=Sul Fluminense; BaixLit=Baixada Litorânea; NorFlu=Norte Fluminense; NoroFlu=Nororeste Fluminense; CenFlu=Centro Fluminense.

Quadro 2. Sequências de *Ehrlichia canis* dos genes *gp19*, *gp36* e *p28* obtidos no GenBank utilizados no presente estudo.

<i>gp36</i>	Código de Acesso	<i>gp19</i>	Código de Acesso	<i>p28</i>	Código de Acesso
<i>Ehrlichia canis</i> - Jake EUA	DQ085427	<i>Ehrlichia canis</i> Jake EUA	DQ858221	<i>Ehrlichia canis</i> - Jaboticabal Brasil	EF014897
<i>Ehrlichia canis</i> - Duque de Caxias Brasil	KF233413	<i>Ehrlichia canis</i> Lousiania	DQ858224	<i>Ehrlichia canis</i> - Carolina do Norte EUA	AF082749
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	EF551366	<i>Ehrlichia canis</i> Florida	DQ858225	<i>Ehrlichia canis</i> - Carolina do Norte EUA	AF082748
<i>Ehrlichia canis</i> - Nigéria	JN982341	<i>Ehrlichia canis</i> México	DQ858226	<i>Ehrlichia canis</i> - Demon EUA	AF082747
<i>Ehrlichia canis</i> - Nigéria	JN982338	<i>Ehrlichia canis</i> São Paulo	DQ860145	<i>Ehrlichia canis</i> - Oklahoma EUA	AF082746
<i>Ehrlichia canis</i> - Duque de Caxias Brasil	KF233414	<i>Ehrlichia canis</i> Taiwan	EF587270	<i>Ehrlichia canis</i> - Lousiana EUA	AF082745
<i>Ehrlichia canis</i> - República Tcheca	KC479021	<i>Ehrlichia canis</i> Taiwan	EU139492	<i>Ehrlichia canis</i> - Flórida EUA	AF082750
<i>Ehrlichia canis</i> - República Tcheca	KC479020	<i>Ehrlichia canis</i> Estados Unidos	HW577579	<i>Ehrlichia canis</i> - Filipinas	JQ663860
<i>Ehrlichia canis</i> - República Tcheca	KC479019	<i>Ehrlichia canis</i> Nigéria	JN982337	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	CR925678
<i>Ehrlichia canis</i> - EUA	KT357370			<i>Ehrlichia ewingii</i>	AF287966
<i>Ehrlichia canis</i> - EUA	KT357369			<i>Ehrlichia chaffensis</i>	CP000236
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	EF651794			<i>Anaplasma platys</i>	GU357493
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	HQ009756			<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	EU008082
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	EU13949			<i>Anaplasma marginale</i>	AY786994
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	EF560599			<i>Neorickettsia risticii</i>	HQ906682
<i>Ehrlichia canis</i> - Tailândia	KT363877			<i>Neorickettsia risticii</i>	HQ906682
<i>Ehrlichia canis</i> - Tailândia	KT363876			<i>Ehrlichia chaffensis</i>	AF479833
<i>Ehrlichia canis</i> - Tailândia	KT363875				
<i>Ehrlichia canis</i> - Nigéria	JN622143				
<i>Ehrlichia canis</i> - EUA	DQ146155				
<i>Ehrlichia canis</i> - Taiwan	HM188566				
<i>Ehrlichia canis</i> - Florida EUA	DQ146152				
<i>Ehrlichia canis</i> - Louisiana EUA	DQ146151				
<i>Ehrlichia canis</i> - São Paulo Brasil	DQ146154				

<i>Ehrlichia canis</i> - Carolina do Norte EUA	DQ146153				
<i>Ehrlichia canis</i> - Oklahoma EUA	DQ085428				
<i>Ehrlichia canis</i> - Monte Negro Brasil	JX312082				
<i>Ehrlichia canis</i> - Cuiaba Brasil	JX312079				
<i>Ehrlichia canis</i> - Belem Brasil	JX29924				
<i>Ehrlichia canis</i> - Londrina Brasil	JX312080				
<i>Ehrlichia canis</i> - Demon EUA	DQ085429				

3.7 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRRJ (CEUA/UFRRJ), sob o N.º de processo 072/2014 (Anexo I), e atende aos princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais. Todos os procedimentos foram realizados por uma equipe de médicos veterinários capacitados.

No momento da coleta, os tutores foram informados a respeito do projeto de pesquisa e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II) foi lhes apresentado, ficando claro que a pesquisa não geraria nenhum tipo de ônus aos mesmos.

4 RESULTADOS

4.1- Detecção do DNA de *Ehrlichia canis* em amostras de sangue cães

Antes de avaliar a diversidade genética de *E. canis*, as amostras foram submetidas à detecção molecular por *16S rDNA*-qPCR. Foram coletadas 267 amostras de sangue de cães do estado do Rio de Janeiro. Entre as amostras analisadas, 42,3% (n = 113/267) foram positivas para qPCR para o gene *16S rDNA* de *E. canis*. O valor médio de Cq observado nas amostras positivas foi de $34,1 \pm 5,1$, variando entre 18 e 40 ciclos. O limite de detecção do qPCR foi de 10 cópias do plasmídeo por μL contendo um gene *16S rDNA* de *E. canis*. O coeficiente de determinação das sete diluições testadas na curva padrão foi de 99,9% e eficiência de 95,7%. Ao realizar PCR para os genes *gp19* e *gp36*, 100% (n=113/113) e 5,3% (n=6/113) das amostras foram positivas, respectivamente. As seis amostras positivas para PCR para o gene *16S rDNA* também amplificaram o gene *p28*. Apenas uma amostra PCR positiva para os três genes (*gp19*, *gp36* e *p28*) em cada uma das seis mesorregiões foi selecionada e submetida à análise de sequências de aminoácidos e nucleotídeos.

A frequência em cada mesorregião para os 113 animais positivos para *E. canis*, pelo gene *16S rDNA*, foi de 59,29% (n=67/113) para mesorregião Metropolitana, 13,27% (n = 15/113) para região Sul Fluminense, 15,04% (n=17/113) para mesorregião Norte Fluminense, 5,3% (n= 6/113) para mesorregião Centro Fluminense, 4,42% (n=5/113) na mesorregião Noroeste Fluminense e 2,65% (n = 3/113) na Baixada Litorânea.

4.2 Análise do alinhamento das sequências de nucleotídeos e das sequências de aminoácidos

As amostras amplificadas com o gene *gp19* oriundas das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro apresentaram 100% de identidade entre si e com outras sequências de *E. canis* do Brasil e de outros países do mundo (100% de cobertura). O perfil genético das sequências de *E. canis*, baseados no gene *gp19*, foi altamente conservado. Na análise da sequência parcial do polipeptídeo, deduzido a partir da sequência de nucleotídeos do gene *gp19*, não foi observado nenhum ponto de mutação. Na análise das sequências de aminoácidos deduzidas dos genes *gp36* e *p28*, das seis sequências do estado do Rio de Janeiro, determinou-se que ambos os genes apresentaram identidade de nucleotídeos e aminoácidos variando de 99,80% a 100%, respectivamente. Comparando com as sequências de referência Jake-EUA (DQ085427) para *gp36* e Jaboticabal- Brasil (EF014897) para *p28*, todas as sequências apresentaram identidades de *p28*: 99,98% e *gp36*: 99,80%, exceto *E. canis*- Baixlit (100%) no gene *p28* e *E. canis*-Noroflu e *E. canis*-Sulflu (100%) no gene *gp36*.

Dentre as seis amostras amplificadas para o gene *gp36*, não foi possível realizar o sequenciamento de amostras oriundas da mesorregião Centro Fluminense devido à dificuldade na amplificação do gene *gp36* utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores descritos por Chen et al. (2010). Sequências dos Estados Unidos (DQ146151-DQ14153, DQ085427-DQ085429) demonstram que o gene *gp36* possui uma região inicial de 429 pb e uma região com sequências repetidas em série (Tandem-Repeat) com aproximadamente 303 pb. Apesar de ter ocorrido variação no tamanho final das amostras sequenciadas, as mesmas foram alinhadas, resultando em um conjunto de dados final com 732 pb.

Na análise de identidade do gene *gp36*, as sequências do presente estudo apresentaram variação de 99,88% a 100% quando comparados com outras amostras de países como os Estados Unidos da América (USA), Taiwan, República Tcheca, Tailândia e Nigéria (sequências disponíveis no GenBank). Na região inicial, da posição 1 até a 92, o alinhamento

das sequências do gene *gp36* obtidas de cinco sequências das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro revelaram 100% de identidade nesta região, mesmo sendo oriundas de áreas distintas do estado do Rio de Janeiro. Contudo, a partir da posição 92 podemos observar variações de nucleotídeos resultando em 9 pontos de mutações (posição 92 a 331) (Tabela 2).

Tabela 2. Diferenças de nucleotídeos do gene parcial (*gp36*) entre as sequências de *Ehrlichia canis* disponíveis no presente estudo e a sequência de referência disponível no GenBank.

Sequências	Posição dos nucleotídeos ^a								
	92	136	137	209	215	232	235	325	331
<i>Ehrlichia canis</i> Jake- EUA(DQ085427)	G	G	A	C	C	G	A	A	G
<i>Ehrlichia canis</i> -SulFlu(97)	A	A	G	T	.	A	G	G	A
<i>Ehrlichia canis</i> -Met(443)	A	A	G	T	.	A	G	.	A
<i>Ehrlichia canis</i> -NoroFlu(249)	A	.	.	T	.	A	.	.	.
<i>Ehrlichia canis</i> -NorFlu(128)	A
<i>Ehrlichia canis</i> -BaixLit(121)	A	.	.	.	G

^a Posição baseada na sequência de *E. canis* (DQ085427). Os pontos "." representam as regiões conservadas.

Na análise de agrupamento, pode-se observar a formação de três clados (Clados A, B e C) suportados por alto valor de Bootstrap (99%). Todas as sequências do presente estudo se agruparam no Clado A, juntamente com as sequências dos EUA, sugerindo uma semelhança genética entre as sequências brasileiras e americanas. O Clado A inclui as amostras dos EUA, Brasil, República Tcheca e Nigéria. O Clado B está representado por amostras da República Tcheca e Taiwan. O Clado C está formado apenas por sequências brasileiras dos estados do Paraná (JX312080), Mato Grosso (JX312079) e Rio Grande do Sul (JX312082) (Figura 2).

O número de repetição seriada em TRP36 de *E. canis* de todas as sequências do estado do Rio de Janeiro foi completamente conservado, codificando nove aminoácidos (TEDSVSAPA) e o número de variações foi de 11 cópias. Oito pontos de polimorfismo foram observados na cadeia de aminoácidos e cinco deles estiveram entre os aminoácidos 31 e 111, sendo este local o de maior variabilidade. Todas as amostras apresentaram um Ácido aspártico (D) na posição 31 quando comparados com a sequência-referência Jake (DQ085427) (Tabela 3), que possui uma Glicina (G) na mesma posição.

Tabela 3. Diferenças de aminoácidos na sequência parcial do polipeptídeo deduzido a partir de TRP36 entre sequências de *Ehrlichia canis* obtidos de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e sequências do Brasil depositados no GenBank.

Sequências	Posição do aminoácido ^a											TRP*
	10	19	23	31	46	70	72	78	79	86	111	145-240
<i>Ehrlichia canis</i> Jake- EUA(DQ085427)	M	N	H	G	E	A	A	D	M	V	V	TEDSVSAPA ¹²
<i>Ehrlichia canis</i> -SulFlu (97) MG584545	.	.	.	D	R	V	.	N	V	.	M	TEDSVSAPA ¹¹
<i>Ehrlichia canis</i> -Met (443) MG584548	.	.	.	D	R	V	.	.	V	.	M	TEDSVSAPA ¹¹
<i>Ehrlichia canis</i> -NoroFlu (249) MG584549	.	.	.	D	.	.	.	N	.	A	.	TEDSVSAPA ¹¹
<i>Ehrlichia canis</i> -NorFlu (128) MG584546	.	.	.	D	TEDSVSAPA ¹¹
<i>Ehrlichia canis</i> -BaixLit (121) MG584547	.	.	.	D	.	.	G	TEDSVSAPA ¹¹
<i>Ehrlichia canis</i> -Caxias Brasil KF233413	K	G	N	S	G	V	.	N	.	.	M	TEDSVSAPA ⁸
<i>Ehrlichia canis</i> -Caxias Brasil KF233414	K	V	.	N	.	.	M	TEDSVSAPA ⁵
<i>Ehrlichia canis</i> -Cuiabá Brasil JX312079	.	G	N	.	G	V	.	N	.	A	M	ASVVPEAE ¹³
<i>Ehrlichia canis</i> -Montenegro Brasil JX312082	.	G	N	.	G	V	.	N	.	A	M	ASVVPEAE ¹⁰
<i>Ehrlichia canis</i> -Londrina Brasil JX312080	.	G	N	.	G	V	.	N	.	A	M	ASVVPEAE ¹⁵

^a Posição baseada na sequência de *E. canis* (DQ085427). Os pontos ‘.’ representam regiões conservadas.

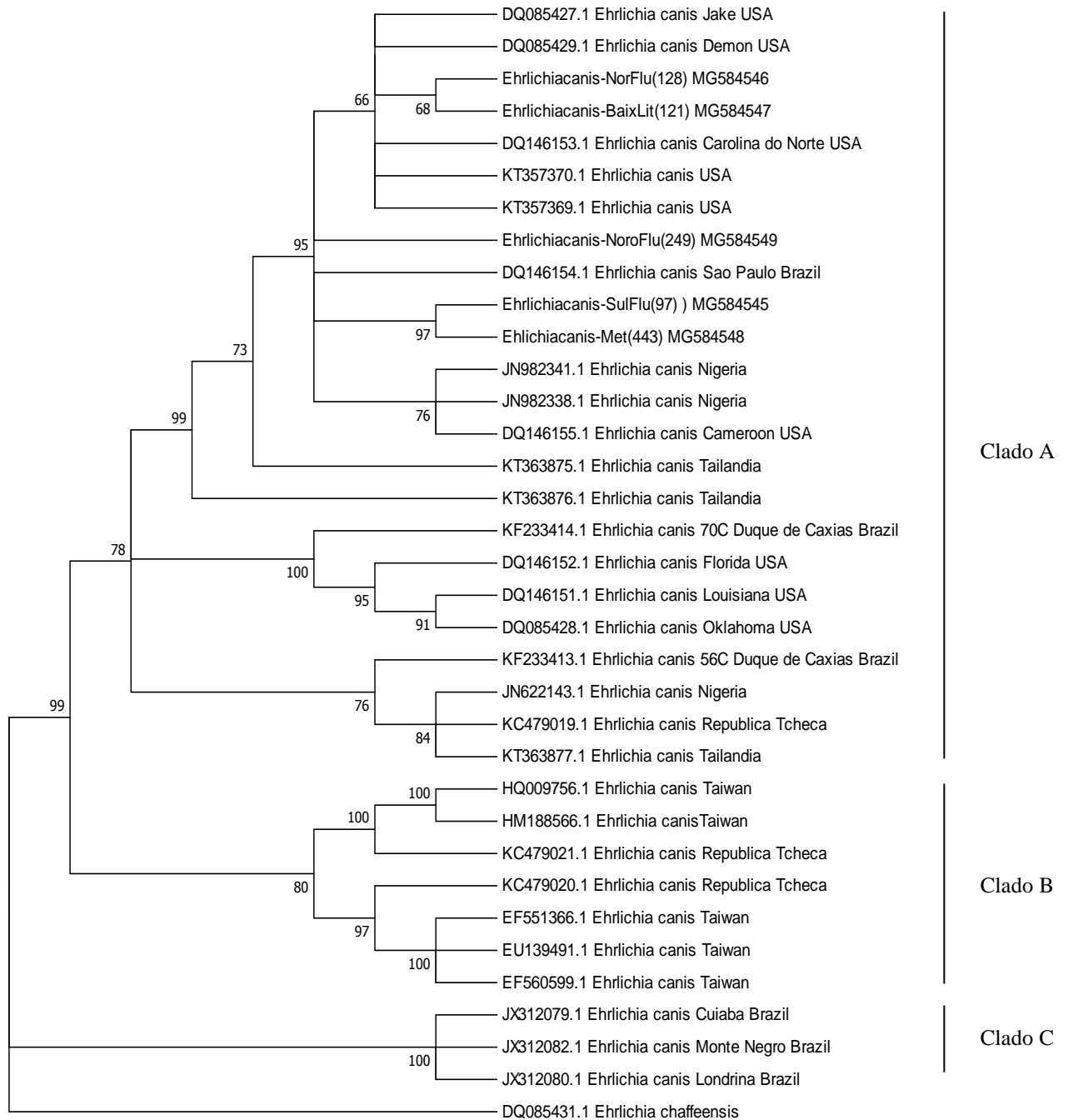


Figura 2. Dendograma obtido a partir da sequência *degp36* das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendograma foi construído usando o método Neighbor-joining e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 *bootstrap* que suportaram o ramo. A sequência de *Ehrlichia chaffeensis* (DQ085431) foi utilizada como um *outgroup*.

Na análise de agrupamento do gene *p28*, pode-se observar a formação de dois clados (Clados A e B) suportados por alto valor de Bootstrap (100%). Todas as sequências do presente estudo agruparam-se no Clado A, juntamente com outras sequências do Brasil (EF014897), sugerindo uma semelhança genética entre estas sequências. O Clado B está representado por amostras dos EUA (Figura 3). A identidade do gene *p28* de *E. canis* entre as sequências obtidas no presente estudo variou de 99,98% a 100%, tendo como referência amostra de Jaboticabal (EF014897).

A proteína P28 da amostra Jaboticabal foi divergente em aproximadamente 10 aminoácidos quando comparados com as sequências do presente estudo. Entre as amostras analisadas podem-se perceber divergências em alguns aminoácidos. Na posição 156 observou-se a presença de duas mutações na mesma posição (156) em todas as sequências (Tabela 4) quando comparados com a sequência de referência Jaboticabal (EF014897).

Considerando-se a similaridade entre as duas espécies do gênero *Ehrlichia*, as sequências do presente estudo foram alinhadas com uma amostra de *E. chaffeensis* (CP000236). A similaridade entre as sequências foi de 79%. Foi possível perceber a formação de três clados distintos, dado a significativa distância entre as espécies. No Clado A, estão alocadas as amostras do presente estudo e o sequência Jaboticabal (EF014897) no Clado B, *E. chaffeensis* aparece isolada (Figura 3).

Para estabelecer a posição de *E. canis* dentro da ordem Rickettsiales, utilizando o gene codificador da proteína externa de membrana *p28*, uma inferência foi realizada entre as amostras do presente estudo e indivíduos da ordem. A similaridade entre *E. canis* do presente estudo e outros organismos da ordem variou de 33% a 80% demonstrando distância entre estas bactérias. Na reconstrução filogenética observou-se que todas as amostras positivas para *E. canis* agruparam-se em um Clado com alto valor de Bootstrap (91%) juntamente com outras espécies de *E. canis*, inclusive de Jaboticabal (EF014897) e dos Estados Unidos. A formação de outros clados com outros gêneros e espécies também foi observada (Figura 4).

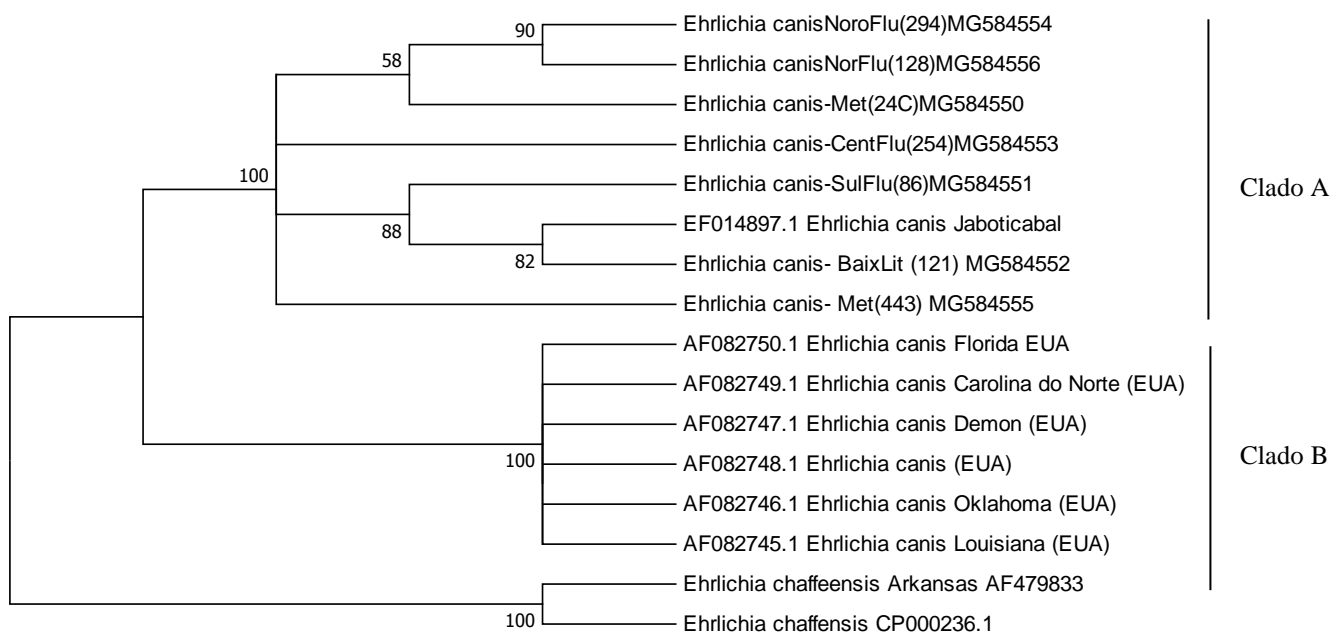


Figura 3. Dendrograma obtido a partir da sequência do polipetídeo P28 de *Ehrlichia canis* deduzido a partir da sequência parcial do gene *p28* das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendrograma foi construído usando o método Neighbor-joining e os números internos indicam os percentuais das réplicas em 1000

bootstrap que suportaram o ramo. As sequências de *Ehrlichia chaffeensis* (AF479833 e CP000236) foram utilizadas como um *outgroup*.

Tabela 4. Diferenças de aminoácidos na sequência parcial do polipeptídeo deduzido a partir de P28 entre sequências de *Ehrlichia canis* obtidos de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

Sequências	Posição dos aminoácidos ^a									
	58	60	72	80	84	96	156	206	252	259
<i>Ehrlichia canis</i> SP- Brasil (EF014897)	S	P	Q	T	I	S	S	I	E	S
<i>Ehrlichia canis</i> -NoroFlu (294) (MG584554)	R	S	N	S	T	N	D	.	G	N
<i>Ehrlichia canis</i> -NorFlu (128) (MG584556)	R	S	N	S	T	N	D	.	G	N
<i>Ehrlichia canis</i> -Met (24C) (MG584550)	R	S	N	S	T	N	N	T	G	N
<i>Ehrlichia canis</i> -CenFlu (254) (MG584553)	R	S	N	S	.	N	N	.	.	.
<i>Ehrlichia canis</i> -Met (443) MG584555	R	S	.	S	T	N	G	.	G	N
<i>Ehrlichia canis</i> -BaixLit (121) MG584552	G	.
<i>Ehrlichia canis</i> -SulFlu (86) MG584551	N	.	G	N

^aPosição baseada na sequência de *E. canis* (EF014897). Os pontos "." representam regiões conservadas.

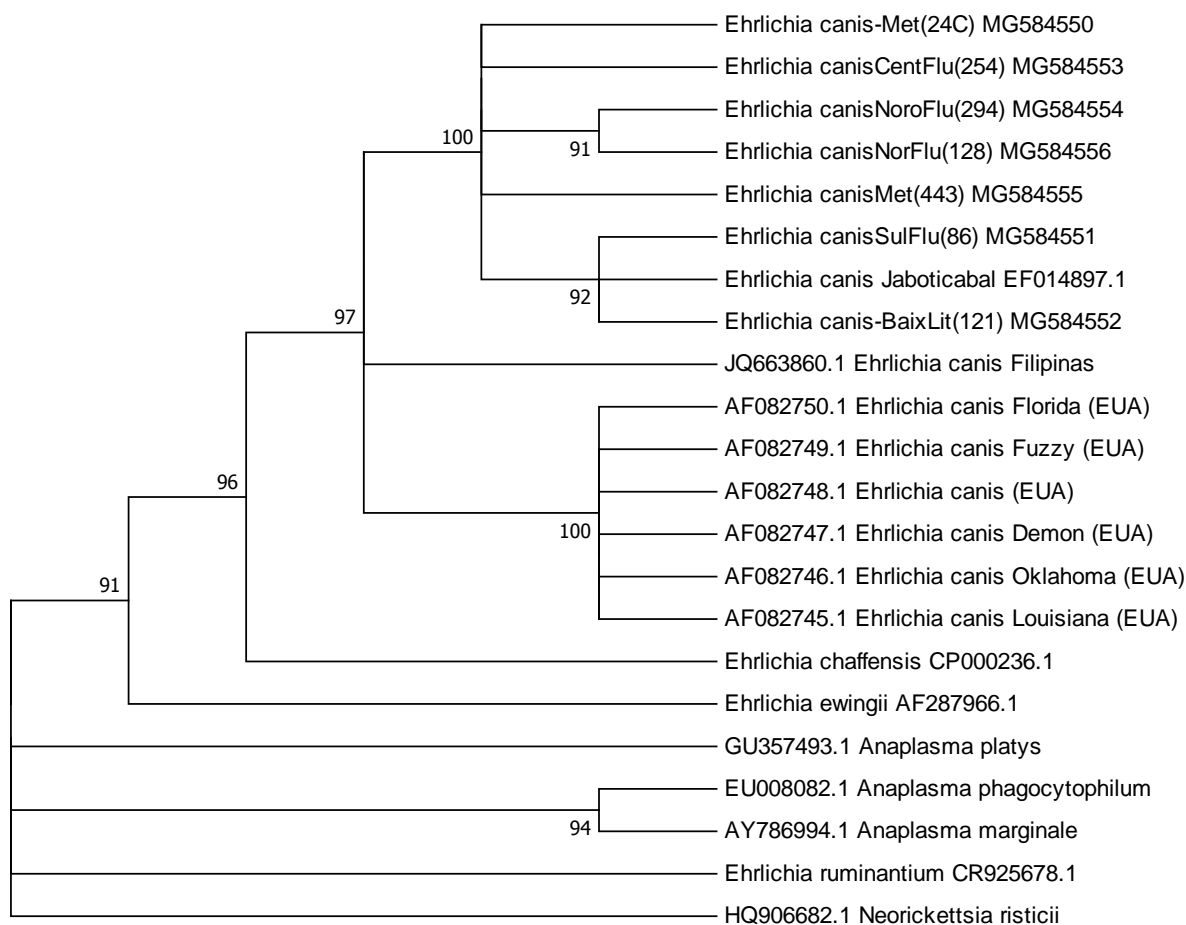


Figura 4. Dendrograma obtido a partir da sequência do polipeptídeo P28 de *Ehrlichia canis* deduzido a partir da sequência parcial do gene *p28* de amostras obtidos de amostras de *Ehrlichia canis* detectadas em cães oriundos das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e organismos da ordem Rickettsiales obtido no GenBank. O dendrograma foi construído usando o método Neighbor-joining e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 *bootstrap* que suportaram o ramo. *Neorickettsia risticii* (HQ906682) foi utilizada como *outgroup*.

4.3 Análise de entropia das sequências de aminoácidos

O resultado da análise da entropia dos alinhamentos de aminoácidos deduzidos dos genes *gp36* e *p28* em sequências de aminoácidos estão demonstrados nas Figuras 5A e 5B, respectivamente. Sete regiões de alta entropia foram distribuídas ao longo de todo o aminoácido TRP36; enquanto que onze sítios de aminoácidos de alta entropia foram encontrados ao longo do gene *p28*. A entropia nos sítios dos aminoácidos TRP36 apresentou-se menor do que em P28. No presente estudo, o valor de entropia dos aminoácidos, TRP36, variou de 0,5 a 0,67 com média de 0,6, identificados entre as posições 40 e 110, representando um tamanho de aproximadamente 70 aminoácidos. Na análise dos aminoácidos do P28 podemos perceber que ocorreu variação de entropia de 0,59 a 1,2 apresentando média de 0,62 entre as posições 55 e 255 representando um tamanho de aproximadamente 200 aminoácidos. O pico com valor aproximado de 1 na posição entre 150 e 160, indica que nesse gene existe regiões com alta variabilidade gênica (Figura 5B). As

regiões representadas por aminoácidos das sequências de P28 apresentaram maior variação quando comparado com sequências de TRP36.

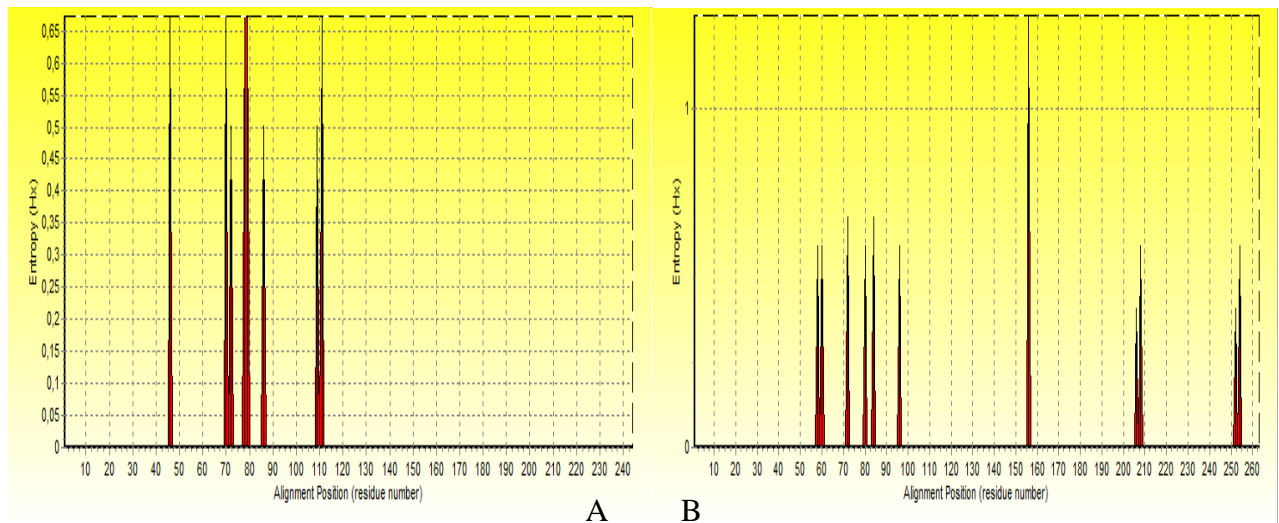


Figura 5. Gráficos de entropia dos aminoácidos. A) Aminoácidos TRP36 de *Ehrlichia canis*. B) Aminoácidos deduzidos do gene *p28* de *Ehrlichia canis*.

4.4 Mutação e Pressão de seleção positiva (Teste Z)

Em todas as amostras foi possível indentificar pontos de mutação. Na Tabela 5 notamos que há três tipos de mutação: duas do tipo não silenciosas e uma silenciosa. A mutação de transição (A ↔ G) ocorreu em todas as amostras na posição 92 e a mutação de transversão (C ↔ G ou C ↔ U) foi identificada nas posições 215 e 331. Apenas na posição 209 ocorreu mutação silenciosa. O sequência SulFlu apresentou o maior número de polimorfismo, com 6 pontos de mutação não-silenciosas. A amostra NorFlu foi a que menos apresentou variação, apenas um ponto na posição 92 (Tabela 5). Os códons que apresentaram mutação não silenciosa produziram aminoácidos distintos como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Sequências parciais do polipeptídeo TRP36 apresentando mutações silenciosas e não silenciosas entre as sequências de *Ehrlichia canis* obtidos de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

Amostra	Posição/Códon							
	92	136	209	215	232	235	325	331
<i>Ehrlichia canis</i> Jake (DQ085427)	GUG	GAA	CUA	CUG	GAU	AUG	AUU	GUG
<i>Ehrlichia canis</i> SulFlu (MG584545)	AUG	AGA	UUA	.	AAU	GUG	GUU	AUG
<i>Ehrlichia canis</i> Met (MG584548)	AUG	AGA	UUA	.	AAU	GUG	.	AUG
<i>Ehrlichia canis</i> NoroFlu (MG584549)	AUG	.	UUA	.	AAU	.	.	.
<i>Ehrlichia canis</i> NorFlu (MG584546)	AUG

Os resultados dos testes baseados em códons com a finalidade de verificar se há seleção positiva nas amostras de *E. canis* (teste Z, MEGA5) também foi realizado. Na análise de *gp36* e *p28*, identificou-se que há pressão de seleção positiva entre as sequências das mesoregiões. A amostra obtida da região SulFlu apresentou significativa seleção positiva quando comparada com a amostra NoroFlu ($p=0,01$) como demonstrado na tabela 6. Isto demonstra que o número de substituições não silenciosas foi maior que as substituições silenciosas. Na comparação entre as amostras NorFlu/ BaixLit e SulFlu/Met não foram observadas pressão de seleção positiva ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Teste de seleção (teste Z) na análise das médias entre todos os pares de sequência dos genes *gp36* e *P28* de *Ehrlichia canis*.

Amostra (gene <i>gp36</i>)	<i>p</i> –valor*	Amostra (gene <i>p28</i>)	<i>p</i> –valor*
NorFlu x BaixLit	$p=0,16$	NorFlu x BaixLit	$p=0,16$
SulFlu x Met	$p =0,16$	SulFlu x Met	$p =0,16$
NorFlu x Met	$p =0,01$	NorFlu x Met	$p =0,01$
SulFlu x NoroFlu	$p =0,01$	SulFlu x NoroFlu	$p =0,01$
BaixLit x NoroFlu	$p =0,02$	BaixLit x NoroFlu	$p =0,02$
NorFlu x NoroFlu	$p =0,04$	NorFlu x NoroFlu	$p =0,04$
Met x NoroFlu	$p =0,01$	Met x NoroFlu	$p =0,01$

* p -valor $<0,05$ foram considerados significativos.

5 DISCUSSÃO

O gene *gp19* demonstrou alto grau de conservação, e resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2014) ao analisar amostras oriundas da região Metropolitana do Rio de Janeiro. Chen et al. (2010) já haviam constatado que o gene *gp19* de *E. canis* é altamente conservado quando analisaram cães com sintomatologia clínica em um Hospital Veterinário em Taiwan/China. Outros trabalhos também citaram a conservação do gene *gp19* em sequências oriundas dos Estados Unidos, Israel, Brasil e Taiwan (ZHANG et al., 2008; CHEN et al., 2010; AGUIAR et al., 2013). Para Brum (2010) a similaridade entre as amostras geograficamente distintas sugere que a proteína GP19 possa ser usada para ensaios imunoenzimáticos de diagnóstico, bem como em programas vacinais, pois esta proteína é específica para *E. canis* não tendo assim reações cruzadas com outras espécies do gênero *Ehrlichia*. A região rica em aminoácidos definidos como Serina-Treonina-Glutamato (STE) já foi utilizada como substrato de antígeno e McBride et al. (2007) demonstraram que o antígeno reagiu fortemente com o soro de um cão infectado, sendo este substancialmente mais reativo com o anticorpo do que o antígeno sintético.

As amostras do presente estudo apresentaram diversidade genética entre as sequências da mesorregião do Rio de Janeiro e entre as sequências mundiais na análise dos genes *gp36* e *p28*. A variabilidade de amostras, ao usar o gene *gp36*, também foi observada por Ferreira et al. (2014), que identificaram diferenças genéticas entre as sequências da região metropolitana do Rio de Janeiro. Os dados baseados na reconstrução filogenética revelaram que amostras oriundas de regiões geográficas mais próximas se apresentaram mais estreitamente relacionados, como ocorreu com as regiões da Baixada Litorânea e Norte Fluminense, bem como a Metropolitana com o Sul Fluminense, que apresentaram 100% de similaridade. Na análise dos aminoácidos, mutações foram observadas em todas as sequências encontradas o que seguiu o padrão também encontrado por Zangh et al. (2008), Aguiar et al. (2013) e Ferreira et al. (2014). A diferença em alguns aminoácidos pode ser suficiente para promover diferenças conformacionais nas proteínas acarretando em implicações estruturais, funcionais e antigênicas (ZWEYGARTH et al., 2014). A região do estudo contém municípios limítrofes favorecendo a movimentação de cães entre os locais, e desta forma ocorre a dispersão do carrapato vetor (MACIEIRA et al., 2005). Aguiar et al. (2013) consideram que as diferenças demonstradas em proteínas envolvidas na resposta imune se devem ao fato de sofrerem maior pressão de seleção e à adaptação da bactéria ao hospedeiro vertebrado e invertebrado; Os mecanismos de evasão utilizados por *E. canis* podem ser influenciados por alterações fenotípicas, onde a principal forma que *E. canis* utiliza para escapar da ação imune do hospedeiro é o bloqueio total das atividades dos linfócitos T CD4, o que favorece a liberação contínua de TNF- α (fator de necrose tumoral- α) pelas células citotóxicas e a constante tentativa do hospedeiro em eliminar o agente etiológico pode resultar em uma pancitopenia (HASEGAWA, 2005). Todo o mecanismo de evasão utilizado pela bactéria pode favorecer a sua adaptação no hospedeiro e com isso ocorrer mutações em seu código genético resultando em diferenças genéticas em *E. canis* nas diferentes regiões geográficas em que ocorre.

Existem dois genótipos de *E. canis* circulando no estado do Rio de Janeiro, baseado no gene *gp36*. Os dois genótipos descritos no presente estudo diferenciam-se através da sequência de repetição, tendo como padrão no Clado C a repetição ASVVPEAE descrita por Aguiar et al. (2013) e a repetição TEDSVSAPA presente nas sequências de *E. canis* dos EUA (Clado A) e em uma amostra do estado do Rio de Janeiro (Ferreira et al., 2014). Todas as sequências do presente estudo apresentaram 11 repetições, similar ao encontrado por Aguiar et al. (2013) e superior ao encontrado por Ferreira et al. (2014), que identificaram de 5 a 8 repetições em um fragmento de 840 pb. A sequência ASVVPEAE, do Clado C, foi observada apenas nas regiões norte e sul do Brasil, enquanto no clado A, que continha também

sequências dos EUA, foram identificadas *E. canis* oriundas das regiões nordeste, sudeste e centro-oeste do Brasil (AGUIAR et al., 2013; FERREIRA et al., 2014; ZWEYGARTH et al., 2014). Aguiar et al.(2013) e Ferreira et al.(2014) encontraram a mesma tendência de agrupamento das sequências brasileiras.

Embora a utilização do gene *p28* possa representar uma ferramenta útil no diagnóstico de *E. canis*, existem poucas sequências disponíveis no GenBank para este gene. Este fato limita uma análise mais robusta da variabilidade genética das sequências estudadas. As sequências do gene *p28* de *E. canis* das amostras oriundas das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro revelaram um alto grau de identidade com as amostras analisadas de Jaboticabal (99% a 100%) e com as amostras de Carolina do Norte, Oklahoma, Louisiana e Filipinas (99%). Esses resultados mostram que há um significativo grau de conservação das amostras brasileiras, americanas e asiática. Estudos anteriores já observaram que o gene *p28* é útil para produção de vacinas e padronização de métodos de imunodiagnóstico visto a alta conservação gênica deste gene em *E. canis* do Brasil e EUA (EF014897; AF082750) (McBRIDE et al., 1999; NAKAGHI, 2008). Apesar da similaridade encontrada entre as sequências do estudo de Jaboticabal, importantes alterações nas sequências de aminoácidos foram observadas com aproximadamente 4% dos aminoácidos apresentando divergências. Para Nakaghi (2008) estas diferenças correspondem às diferenças entre as sequências de aminoácidos das proteínas e os fatores associados a essas divergências, podendo estar associadas a pressão de seleção exercida sobre os microrganismos e seus hospedeiros (AGUIAR et al., 2013).

Neste estudo, a identidade das sequências de *E. canis* oriundos do estado do Rio de Janeiro, foi de 79% com *E. chaffensis*. O gene *p28* utilizado para detecção de *E. canis* demonstrou especificidade para o diagnóstico de erliquiose. Esta especificidade é de extrema importância quando utilizada em condições naturais ou experimentais que envolvem infecções concomitantes (STICH et al., 2002). No presente estudo, determinou-se que o gene *p28* constitui ótima ferramenta para caracterização molecular de *E. canis*, fato observado também em outros trabalhos (MCBRIDE et al., 2000; NAKAGHI et al. 2010).

Comparar e caracterizar um organismo fornece informações importantes sobre a resposta imune do hospedeiro, além de servir como base para a identificação de novos marcadores moleculares para o diagnóstico específico da EMC. Tais fatores dependem de um entendimento das diferenças que podem ocorrer em sequências de *E. canis* geograficamente dispersas. Deve-se considerar que a variabilidade gênica desta bactéria influencia diretamente na eficácia de novas técnicas de diagnóstico e no desenvolvimento de vacinas.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo representa uma análise genética robusta de *E. canis* em cães naturalmente infectados. As divergências genéticas encontradas nas amostras do estado do Rio de Janeiro são úteis para uma melhor compreensão da cadeia epidemiológica. Os mecanismos responsáveis por tais divergências genéticas em *E. canis* ainda são desconhecidos, mas o fato de esses polimorfismos ocorrerem em genes que codificam proteínas sugere que a pressão imunológica e a adaptação ao hospedeiro invertebrado desempenham um papel importante na sobrevivência da bactéria.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCETTA, E.M.T. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) trombocitopênicos da região dos lagos do Rio de Janeiro. 2008.61f. (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas) – Instituto de Veterinária, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Revista Ciência Rural**, v.37, n.3, 2007.
- AGUIAR, D.M.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M. *In vitro* isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.489-493, 2008.
- AGUIAR, D.M.; ZHANG, X.; MELO, A.L.T.; PACHECO, T.A.; MENESES, A.M.C.; ZANUTTO, M.S.; HORTA, M.C.; SANTARÉM, V.A.; CAMARGO, L.M.A.; MCBRIDE, J.W.; LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.315-321, 2013.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321-325, 2008.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.
- BREMER, W.G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transtadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Vet. Parasitol.**, v.131, p.95-105, 2005.
- BREITSCHWERDT, E.B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. Doenças do cão e do gato. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.422-429, 2004.
- BRUM, F.A. **Cloning and Expression of the gp19 protein of *Ehrlichia canis***. 2010. 10f. Dissertação (Mestrado: Biologia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- BUSTIN SAI, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**. 55:(4), p. 611-22. 2009.
- CÁRDENAS, A.M.; DOYLE, C.K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTVET, R.E.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Conserved Immunoreactive Glycoproteins TRP36 and gp19 Has Enhanced Sensitivity and Provides Species-Specific Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n.2, p.123-128, 2007.

CARRILLO, B.J.; RESENDE, H.E.B. & MASSARD, C.L. **Erliquiose canina no Estado do Rio de Janeiro**, Brasil. XV Congresso Brasileiro de medicina Veterinária. Rio de Janeiro. Anais. p. 162, 1976.

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

COHN, L. Ehrlichiosis and related infections. **Vet. Clin.Small Anim** ., v.33, n.33, p.863–884, 2003.

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

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. Model Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat. Methods**, v.30, p.772, 2012.

DAVOUST, B.; PARZY, D.; VIDOR, E.; HASSELOT, N.; MARTET, G. Ehrlichiose canine experimentale : étude clinique et thérapeutique. **Rev. Méd. Vét.**, v.167, p.33-40, 1991.

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

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chein. **Bull Soc. Pathol. Exot.**, v.28, p.418–419. 1935.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p.504-510, 2005.

DUMLER J.S.; BARBET A.F.; BEKKER C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, p.2145-65, 2001.

EIRAS, D.F.; CRAVIOTTO, M.B.; VEZZANI, D.; EYAL, O.; BANETH, G. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.36, n.2, p.169-73, 2013.

EWING, S.A. Canine Ehrlichiosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.13, p.331-353, 1969.

EWING, S.A.; HARKESS, J.R.; KOCAN, K.M.; BARKER, R.W.; FOX, C.; TYLER, R.D.; COWELL, R.L. Failure to Transmit *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) with *Otobius megnini* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v.27, n.5, 1990.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; CASTRO, T.X.; FERREIRA, E.O.; NEVES, F.P.G.; BARBOSA, A.V.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.P. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Braz. Parasitol. Vet.** v.23, n.3, p.301-308, 2014.

GREGORY, C.; FORRESTER, S.O. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, *E. risticii* infections. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders, p.404-414, 1990.

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 1387p., 2006.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am. J. Vet. Res.**, v.36, 937–940, 1975.

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

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

HUXSOLL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K. NIMS, R.M.; WALKER, J.S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.157, n.11, p.1627-1632, 1970.

HASEGAWA, M.Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: Aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. 2005. 136f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Programa de Pós Graduação em Clínica veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-FMVZ, SP, 2005.

HUANG, C.H.; CHANG, M.T.; HUANG, L.; CHU, W.S. Utilization of elongation factor Tu gene (tuf) sequencing and species-specific PCR (SS-PCR) for the molecular identification of *Acetobacter* species complex. **Mol. Cell Probes.**, v.28, n.1, p.31-3. 2014.

IBGE, 2010. Municípios. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

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

KAMANI, J.; LEE, C.C.; HARUNA, A.M.; CHUNG, P.J. WEKA, P.R.; CHUNG, Y.T. First detection and molecular characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Nigeria. **Res Vet Sci.**, v.94, n.1, p.27-32. 2013.

KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **Vet.Diagn.Invest.**, v.13, p.521–523, 2001.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n.1, p.24-32, 2001.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453- 2465, 2002.

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

MAAZI, N.; MALMASI, A.; SHAYAN, P.; NASSIRI, S.M.; SALEHI, T.Z.; FARD, M.S. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* in naturally exposed dogs in Iran: an analysis on associated risk factors. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v. 23, n. 1, p. 16-22, 2014.

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

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

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

MCBRIDE, J.W.; DOYLE, C.K.; ZHANG, X.; CARDENAS, A.M.; POPOV, V.L.; NETHERY, K.A.; WOOD, M.E. Identification of a Glycosylated *Ehrlichia canis* 19-Kilodalton Major Immunoreactive Protein with a Species-Specific Serine-Rich Glycopeptide Epitope. **Infection and Immunity**, v.75, n.1, p.74–82, 2007.

MCBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. **Expert Rev Mol Med**. v.31, n.13, p.e3, 2011.

MITTAL, M.; KUNDU, K.; CHAKRAVARTI, S.; MOHAPATRA, J.K.; NEHRA, K.; SINHA, V.K.; SANJEETH, B.S.; CHURAMANI, C.P.; KUMAR, A. Canine Monocytic Ehrlichiosis among working dogs of organised kennels in India: A comprehensive analyses of clinico-pathology, serological and molecular epidemiological approach. **Prev. Vet.Med.**, v.1, n.147, p.26-33.2017.

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

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. CANINE Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, p.766-770, 2008.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; FERRO, J.A.; LABRUNA, M.B.; CHRYSSAFIDIS, A.L.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal. v.19, p.75-79, 2010.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.766-770, 2008.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; FERRO, J.A.; LABRUNA, M.B.; CHRYSSAFIDIS, A.L.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v.19, n.2, p.75-79, 2010.

NEGRUTSKII, B.S.; EL'SKAYA, A.V. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v.60, p.47-78. 1998.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution** 3:418-426, 1986.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.6, p.1661-9. 1999.

PALMER, S.O.; RANGEL, E.Y.; MONTALVO, A.E.; TRAN, A.T.; FERGUSON, K.C.; BULLARD, J.M. Cloning and characterization of EF-Tu and EF-Ts from *Pseudomonasaeruginosa*. **Biomed Res. Int.**, v.2013, p.1-12, 2013.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**. V.14, p.817-818, 1998.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, p. 215-221, 1996.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins Baltimore. p.704-709, 1984.

RODGERS, S.J.; MORTON, R.J.; BALDWIN, C.A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p.154-159, 1989.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ, 265p, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.** v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.; COSTA, R.L.; SANTOS, T.M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasit Vectors**, v.11, n.6, p.348. 2011.

SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.; PECKLE, M.; DA COSTA, R.L.; VITARI, G.L.; SANTOS, L.A.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.28, n.5, p.529-35. 2016.

SILVA, V.L.D.D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose Canina.** 2001. 102f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

STEPHENSON, E.H.; OSTERMAN, J.V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, p.1815-1819, 1977.

STICH, R.W.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; NEEDHAN, G.R.; GROVER, D.L.; JITTAPALAPONG, S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, Feb, v.40, n.2, p.540-6. 2002.

SVEC A, C, Tichopa D. B., Novosadova, V., Michael W. Pfaffl, M. W., Kubistaa, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2015.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Genus IV. *Ehrlichia*, In: KRIEG, N.R. (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology.** The Williams & Wilkins Co., Baltimore. v.1, p.704-709. 1984.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.2731-2739, 2013.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** V.11:(22), p.4673-4680, 1994.

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

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.2788-2793, 2001.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; MEYLAN, V.; KLAENHAMMER, T.R.; ZINK, R. Analysis, characterization, and loci of the tufgenes in *lactobacillus* and *bifidobacterium* species and their direct application for species identification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n.11, p.6908-22. 2003.

WELLMAN, M.L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R.M.; KOCIBA, G.J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, v.24, p.223–229, 1988.

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

YU, X.J.; MCBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Genetic diversity of the 28-kilodalton outer membrane protein gene in human isolates of *Ehrlichia chaffeensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.4, p.1137-43. 1999.

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

ZWEYGARTH, E.; CABEZAS-CRUZ, A.; JOSEMANS, A.I.; OOSTHUIZEN, M.C.; MATJILA, P.T.; LIS, K.; BRONISZEWSKA, M.; SCHOL, H.; FERROLHO, J.; GRUBHOFFER, L.; PASSOS, L.M. In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein TRP36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. **Ticks Tick Borne Dis.**, v.5, n.4, p.423-31. 2014.

CAPÍTULO II

ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *16S rDNA* E FATOR DE ALONGAMENTO TERMO-INSTÁVEL (*tuf*) PRESENTES EM *Ehrlichia canis* DE CÃES, MESORREGIÕES DE BAIXADA LITORÂNEA E METROPOLITANA, DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

COSTA, Renata Lins. **Análise molecular dos genes *16S rDNA* e Fator de alongamento termo-instável (*tuf*) presentes em *Ehrlichia canis* de cães, mesorregiões de Baixada Litorânea e Metropolitana, do estado do Rio de Janeiro.** 2018. 19p. Tese (Doutora em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O objetivo do presente estudo foi de utilizar os genes *16S rDNA* e fator de alongamento termo-instável (*tuf*) para a caracterização molecular de amostras de *Ehrlichia canis* obtidas de cães das mesorregiões de Baixada Litorânea e Metropolitana. Os 169 espécimes foram obtidas de cães através de venopunção cefálica e em seguida foram dispostas em tubos contendo anticoagulante e transportado até ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No laboratório, os sangues foram alíquotadas e realizada a extração de Ácido desoxirribonucléico (DNA). O DNA das amostras foi extraído utilizando kit comercial (Promega®). As amostras da Baixada litorânea e Metropolitana foram submetidas a PCR em tempo real com alvo em 93pb do gene *16S rDNA* para identificação das amostras positivas. Uma PCR foi realizada para a amplificação de 1623 pb de um fragmento do gene *16S rDNA*. Além disso, oligoiniciadores foram desenhados com base no genoma completo de *E. canis* com alvo no gene *tuf* de 1488pb. Para caracterização molecular foi realizada amplificação de uma amostra representativa de cada mesorregião para os genes *tuf* e *16S rDNA*. As amostras foram purificadas (Clean Sweep) e enviadas para o sequenciamento utilizando-se o método Sanger. Na caracterização molecular, *E. canis*-BaixLit e *E. canis*-Met apresentaram identidade de 100% e 99% para os genes *tuf* e *16S rDNA* quando comparados a sequência de referência Jake (CP000107) e Oklahoma (M73221) respectivamente com cobertura (Query cover) de 100%. Mutação não-sinonímia na sequência da amostra da Baixada Litorânea resultou na substituição de um Ácido Glutâmico (E) por uma Lisina (K). Na análise filogenética, tanto na análise da sequência *16S rDNA* como no gene *tuf*, observamos a formação de dois Clados bem definidos com alto valor de “Bootstrap” (100% e 99% respectivamente), o Clado A contendo amostras de *E. canis* e outras espécies do gênero *Ehrlichia* com identidade variando de 97% a 99% para o gene *16S rDNA* e 92% a 100% para o gene *tuf* (100% de cobertura para ambos genes). No Clado B há a presença de outros organismos do gênero *Anaplasma* com distância genética de 0,39 para o gene *tuf* e de 0,09 para o gene *16S rDNA*. O gene *tuf* pode ser utilizado na caracterização molecular de *E. canis*, podendo ainda ser uma ferramenta útil na diferenciação entre espécies deste gênero.

Palavras-chave: Genotipagem; *Ehrlichia canis*, gene *tuf*, pancitopenia tropical.

ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. **Molecular characterization of *Ehrlichia canis* using the thermo-unstable elongation factor gene (*tuf*) in samples of dogs from the mesoregions of Coastal Baixada and Northwest Fluminense.** 2018. 19p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The objective of the present study was to perform the molecular characterization based on the gene of the thermo-unstable elongation factor (*tuf*) from *Ehrlichia canis* samples obtained from dogs domiciled in the Coastal Baixada and Metropolitan regions. The 169 samples were obtained from dogs through cephalic venipuncture, then were placed in tubes containing anticoagulant and transported to the Laboratory of Hemoparasitos e Vetores of the Federal Rural University of Rio de Janeiro. In the laboratory, the samples were aliquoted and the extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) was performed using a commercial kit (Promega®). Primers were designed and the optimization of the reaction was realized. For molecular characterization, a representative sample of each mesoregion for the *tuf* and *16S rDNA* genes was amplified. The *tuf* gene has a fragment of 1488 bp and the *16S rDNA* gene has a fragment of 1623 bp. The samples were purified with commercial kit, and sequenced using the Sanger's method. The "consensus" sequences were assembled and analyzed using the CLC Main Workbench 7.1 software. The two samples showed specific amplifications for the *tuf* and *16S rDNA* genes. In the molecular characterization, *E. canis*-BaixLit and *E. canis*-Met presented 100% and 99% identity for the *tuf* and *16S rDNA* genes when compared to the reference sequence Jake (CP000107) and Oklahoma (M73221), respectively. In the analysis of the *tuf* and *16S rDNA* genes, the Baixada Coastal sample presented 99% identity with *E. canis* already deposited in GenBank, presenting a non-synonymous mutation caused the substitution of a Glutamic Acid (E) by a Lysine (K). In the phylogenetic analysis, both the *16S rDNA* sequence and the *tuf* gene analysis, we observed the formation of two well-defined clades with high Bootstrap values (100% and 99%, respectively). The clade A containing samples of *E. canis* and other species of the genus *Ehrlichia* with identity varying from 97% to 99% for the *16S rDNA* gene, and 92% to 100% for the *tuf* gene. In clade B is present other organisms of the genus *Anaplasma* suggesting a genetic distance. The *tuf* gene can be used in the characterization of *E. canis* and the circulation of different bacterial strains can have influence of the abundant movement of people intra and inter states.

Keywords: Genotyping; *Ehrlichia canis*, gene *tuf*, tropical pancytopenia

1 INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é o agente etiológico da Pancitopenia Tropical Canina (PTC) ou Erliquiose Monocítica Canina (EMC), como é comumente conhecida. É um agente bacteriano intracelular obrigatório que parasita principalmente os monócitos no sangue de cães (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935). É transmitida pelo ixodídeo vetor *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), ou carrapato marrom do cão. Os sinais clínicos desta doença são inespecíficos, porém os mais comuns são febre, inapetência, prostração e epistaxe. Durante a fase aguda da doença ocorre uma significativa diminuição dos elementos figurados do sangue refletindo em uma pancitopenia (DAGNONE et al., 2001). Desde a ocorrência do surto entre 1963 e 1968 em países asiáticos, EMC tornou-se uma patologia frequente na clínica de pequenos animais (TRAPP et al., 2006). Atualmente, no cenário mundial *E. canis* aparece amplamente distribuída. Países como Estados Unidos, Israel, Nigéria, Índia, China, Costa Rica, Coreia, Espanha, Croácia e Brasil já relataram a detecção da bactéria por técnicas sorológicas e moleculares em cães e carrapatos vetores (RODGER et al., 1989; HARRUS et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; KAMANI et al., 2013; MITTAL et al., 2017; ZHANG et al., 2017; MONTENEGRO et al., 2017; SUH et al., 2017; DIAZ-REGAÑÓN et al., 2017; MRLJAK et al., 2017). Por ser uma bactéria de ampla distribuição e de alta morbidade, estudos em busca de novos alvos moleculares têm sido cada vez mais frequentes.

A caracterização molecular de genes evolutivamente conservados, tal como o gene *16S rDNA*, nos dá pouca informação sobre a diversidade das sequências. Então, quando se trata de variabilidade entre organismos de mesma espécie, o gene *16S rDNA* possui variação limitada impedindo a classificação das estirpes em subtipos (MURPHY et al., 1998; OLIVE; BEAN, 1999; DUMLER et al., 2001). A análise da sequência dos genes tio-oxidoredutase (*dsb*), Citrato sintase (*gltA*), genes codificantes de proteínas (*p28*) e glicoproteínas de membrana (*gp19*, *gp36* e *gp200*) estão sendo amplamente utilizados para conhecer a diversidade gênica e antigênica de *E. canis* (DOYLE et al., 2005; ZHANG et al., 2008; CHEN et al., 2010).

O gene *tuf* codifica o Fator de Alongamento (*tuf*). Este fator de alongamento é uma proteína responsável por catalizar a ligação do aminoacil-tRNA (Ácido ribonucléico transportador) ao ribossomo e é caracterizado por ser um constituinte essencial do genoma bacteriano por estar envolvido na formação da cadeia peptídica. A utilização do gene *tuf* na caracterização de estirpes bacterianas torna-se útil, pois é um gene conservado que participa das vias metabólicas, além disso, apresenta boa capacidade em diferenciar espécies bacterianas. O uso do gene *tuf* em bactérias intracelulares ainda não foi realizada, no entanto este gene demonstrou ser um bom alvo para a tipificação de espécies bacterianas do gênero *Lactobacillum*, *Bifidobacterium* (VENTURA et al., 2003) e *Pseudomonas aeruginosa* (PALMER et al., 2013). O objetivo do presente estudo foi de utilizar o gene *tuf* como novo alvo para caracterização de amostras de *Ehrlichia canis* oriundos de cães naturalmente infectados de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares são excelentes ferramentas para o diagnóstico e caracterização molecular de agentes etiológicos, pois são consideradas técnicas de alta especificidade e sensibilidade. Além disso, são capazes de detectar o agente durante a fase crônica da doença, período em que apenas anticorpos anti-*E. canis* seriam detectados em exames sorológicos (IQBAL; RIKIHISA, 1994; MCBRIDE et al., 1996). O diagnóstico molecular para *E. canis* tem sido realizado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), “nested” PCR (nPCR) e PCR em tempo real (qPCR) (MURPHY et al., 1998; DOYLE et al., 2005; BANETH et al., 2008). Além de utilizar esta técnica para diagnóstico, também se tornou útil na tipificação e caracterização de diferentes estipes de microorganismos. Nos últimos anos, muitos estudos em diferentes países utilizaram estas técnicas moleculares para a detecção deste agente (ROMERO et al., 2011; KAMANI et al. 2013; CICUTTIN et al., 2016). Em países como o Brasil, Argentina, Estados Unidos e México, além do diagnóstico, estas técnicas estão sendo utilizadas também para promover a caracterização molecular de *E. Canis* circulantes (ZHANG et al., 2008; AGUIAR et al., 2013; ALMAZÁN et al., 2016). No entanto, cabe ressaltar a necessidade de uma padronização rigorosa das técnicas moleculares bem como a utilização de controles nas reações para obtenção de resultados seguros.

2.2 Alvos gênicos para caracterização molecular de *Ehrlichia canis*

No campo da caracterização molecular, a identificação de novos alvos gênicos de um organismo tornou-se útil nos dias atuais. Os ensaios baseados em PCR constituem a principal abordagem no diagnóstico molecular. Além de necessitar de pequenas quantidades de material biológico para a realização da técnica, a PCR permite a diferenciação dos agentes infecciosos seja pelo uso da técnica Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) na qual enzimas são utilizadas para cortar fragmentos específicos e diferenciar espécies do gênero ou através de produto amplificado sequenciado (BHATTARAI et al., 2009). A importância das técnicas moleculares está na própria característica do ensaio que são intrínsecas à escolha dos iniciadores, conferindo à técnica alta sensibilidade e especificidade (DENIAU et al., 2003).

O gene *16S rDNA* tem sido considerado o principal marcador molecular para filogenia microbiana, sendo utilizado mundialmente com o objetivo de caracterizar sequências de diferentes áreas geográficas. Por ser um gene constitutivo, carrega algumas características úteis na tipificação. Dentre estas características estão: as regiões hipervariáveis, as quais fornecem sequências espécies-específicas, o alto nível de conservação estrutural e a baixa taxa de evolução. Por apresentar alto nível de conservação, este gene é útil na classificação e reclassificação taxonômica de organismos. Dumler et al. (2001) renomearam alguns indivíduos e os redefiniram em novas famílias, como ocorreu com as tribos Rickettsieae e Wolbachieae que foram extintas após análise do *16S rDNA*. Neste mesmo trabalho, com base também no gene *groESL*, alocaram os indivíduos das tribos Wolbachieae e Ehrlichieae na família Anaplasmataceae. Devido a sua pouca variabilidade e baixa taxa de evolução, níveis de divergência de sequências maiores que 0,5% entre os membros do gênero *Ehrlichia*, são fatores considerados suficientes para classificar os organismos como espécies diferentes (LA FONTAINE, TOLLERVEY 2001; WEN et al., 2002). No entanto, cabe ressaltar que apesar das pequenas áreas heterogêneas dentro de um organismo na análise de diferentes genes,

muitas vezes as diferenças encontradas devem-se a erros de sequenciamento ou falhas na enzima (Polimerase) durante a reação de PCR (SUKSAWAT et al., 2001). Apesar de apresentar regiões de hipervariação no gene *16S rDNA* é um gene altamente conservado, o que limita a identificação de variabilidade entre os organismos de uma mesma espécie (OLIVE; BEAN, 1999). Devido a esta pouca variabilidade torna-se necessária a busca por novos marcadores moleculares para a tipagem de organismos de uma mesma espécie.

Reconstruções filogenéticas derivadas de sequências de nucleotídeos dos genes induzido por choque térmico (*groESL*), Ankirina (*anka*), da cintrato sintase (*gltA*) e genes de proteínas de membrana (*gp19*, *gp36*, *p28*) confirmam as relações entre as espécies do gênero *Ehrlichia* previamente determinadas pelo gene *16S rDNA* (MURPHY et al., 1998; OHASHI et al., 1998; ZHANG et al., 2008; CHEN et al., 2010; NAKAGHI et al., 2010; YBAÑEZ et al., 2012).

Qualquer método de tipagem deve ter a capacidade de distinguir e diferenciar sequências independentes, principalmente os que se encontram geograficamente distantes. Zhang et al. (2008) caracterizaram estirpes de *E. canis* em caráter mundial. A determinação das sequências repetidas de aminoácidos da proteína TRP36 (“Tandem Repeat Protein” 36) tem sido utilizada como alvo para tipificação das espécies de *E. canis* de diferentes regiões geográficas. A identificação da variabilidade nas regiões de repetição é útil, pois está associado a mudanças fenotípicas, o que sugere uma importância funcional (O’DUSHLIN, SHIELDS, 2006). Em organismos bacterianos, algumas regiões de repetição do DNA possuem ligação com mecanismos de adaptação, patogenicidade e virulência (VAN BELKUM et al., 1998). Uma substituição de S (Serina) por P (prolina) na região de repetição seriada nas sequências de *E. canis* de Israel já foi suficiente para promover uma diferença conformacional na estrutura proteica, modificando a região do epítipo, a investigação dessa diferença gênica torna-se necessária para estabelecer relação de infectividade ou de virulência deste microorganismo (ZHANG et al., 2008; CHEN et al., 2010). No Brasil, Aguiar et al. (2013) determinaram uma nova sequência de repetição (ASVVPEAE) que não havia sido relatada anteriormente e representa um terceiro clado exclusivo baseado na proteína TRP36. Embora exista uma maior concentração de aminoácidos imunogênicos na região de repetição, este achado sugere que a proteína TRP36 está sob pressão de seleção e que provavelmente está associada a resposta imune do hospedeiro.

O gene *tuf* codifica o fator de alongamento termo-estável (*tuf*), encontra-se na superfície das células e está envolvido na formação da cadeia peptídica, atuando como cofator no RNAt além de ser um componente essencial do genoma bacteriano. Aloca-se na classe de proteínas G, com peso molecular de 43KD e auxilia na síntese proteica ativando o processo de transcrição. (PUTZER, 2000). Por ser um gene conservado que participa de vias metabólicas tornou-se útil na diferenciação de diferentes estirpes bacterianas extracelulares. Ainda não há relatos na literatura a respeito de um ensaio de diagnóstico e caracterização baseado no gene *tuf* para *E. canis*. No entanto, a descrição deste como novo alvo para o diagnóstico de bactérias extracelulares, como *Lactobacillum*, *Bifidobacterium* (VENTURA et al., 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (PALMER et al., 2013) e *Acetobacter* (HUANG et al., 2014) já tem sido relatado. O genoma completo de *E. canis* contém 1,315,030 pb (sequência Jake/EUA NC 007354.1) e neste genoma há 985 genes, dentre eles o gene *tuf*. Este gene possui um fragmento de 1.187 pb e contém uma sequência proteica de 395 aminoácidos (Figura 1).

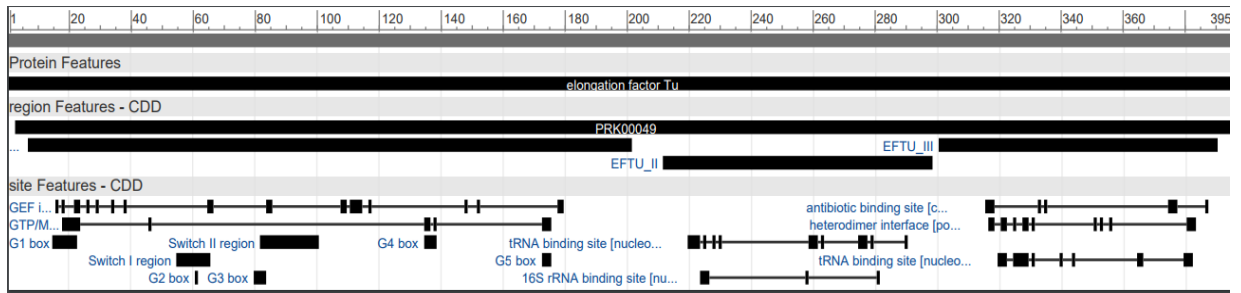


Figura 1. Região do genoma completo de *E. canis* que contém os aminoácidos produzidos pelo gene *tuf*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem, manipulação das amostras e triagem por qPCR para *Ehrlichia canis*

Um total de 169 amostras de sangue de cão doméstico das mesorregiões de Baixada Litorânea (BaixLit) e Metropolitana (Met) foram coletadas. Para realização da caracterização molecular de *E. canis* foi utilizada uma amostra positiva de cada mesorregião citada acima. Os genes alvos eleitos para caracterização foram: gene *16S rDNA* e o gene *tuf*, apresentado neste estudo, como novo alvo molecular para *E. canis*. A mesorregião de Baixada litorânea é uma das seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. É formada pela união de dez municípios agrupados em duas microrregiões, dos Lagos e Bacia de São João. A população estimada está em torno de 677.869 habitantes (IBGE, 2010). A região é tida por ser um local turístico devido às praias e formação de lagos natural. O turismo é responsável por grande parcela do Produto Interno Bruto (PIB) da região (IBGE, 2009). A mesorregião Metropolitana é a maior do estado e comporta trinta municípios com mais de cem mil habitantes. A área territorial comporta 10.230,492 km² (IBGE, 2009) e reúne as principais empresas e grupos nacionais e internacionais do setor naval e outros setores.

As amostras foram coletadas, armazenadas e seu DNA extraído e amplificado segundo métodos já descritos no capítulo I (Seções secundárias 3.1, 3.2 e 3.3).

3.2 Desenho do oligoiniciador com alvo no gene *tuf*

Os oligonucleotídeos iniciadores (oligoiniciadores) foram desenhados baseado no genoma completo de *E. canis*. Inicialmente identificou-se as regiões de “start” (ATG) e “stop” códon (TAG) dando origem a uma sequência de 1.488pb. Posteriormente, as características dos oligoiniciadores foram testadas usando o “software” Oligo Explorer 1.2. A temperatura de dissociação escolhida foi de 60°C admitindo até 2 graus de diferença entre eles. A especificidade dos oligoiniciadores foi testada inicialmente através da ferramenta primer BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). No intuito de estabelecer a sensibilidade (*in situ*) dos oligoiniciadores, utilizou-se sequências disponíveis no “GenBank” que possuíssem o gene *tuf* em seu genoma. Desta forma as sequências de *Anaplasma marginale* (NC012026), *Anaplasma phagocytophilum* (LASP01000002), *Ehrlichia ruminantium* (CR767821), *Ehrlichia chaffeensis* (NZCP007479), *Ehrlichia canis* (CP000107) e *Ehrlichia muris* (CP006917) foram alinhadas pelo método de ClustalW no “software” MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) para a escolha de regiões específicas de *E. canis*. Por ser um fragmento considerado grande para a técnica de sequenciamento de Sanger, oligoiniciadores internos também foram desenhados. O objetivo principal do desenho de oligoiniciadores internos é o de proporcionar uma maior cobertura de sequenciamento, tornando possível e mais confiável a montagem de grandes “contigs”.

3.3 Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* baseada nos genes *tuf* e *16S rDNA*

No intuito de realizar a amplificação e caracterização molecular das amostras de *E. canis*, utilizou-se uma amostra positiva de cada mesorregião (Met e BaixLit). Foi realizada uma PCR convencional com alvo na amplificação de um fragmento de 1.448pb do gene *tuf*. Os oligoiniciadores externos TUF F 5'-ATTTACGCTCTATGTCTCAGG-3' e TUF R 5'-CCTCTTGTTTCACTCCAAGT-3' foram utilizados para amplificação da sequência completa do gene *tuf*. O volume final da reação foi de 25µl contendo: 0,4mM dNTPs, 2,5mM MgCl₂, 0,6µM cada oligoiniciador, 1,5U Taq, 1X Tampão e 300ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos a

94°C por 1 minuto, 60°C por 1:30 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. . Foram utilizados primers internos TUFs F 5'-GATAACAGGTGCTGCACAAAT-3' e TUFs R 5'-TTCTCCTGCATCTAATGCTTT-3' com a finalidade de realizar maior cobertura no sequenciamento das amostras. O controle positivo utilizado está descrito no capítulo I (Seção secundária 3.4). Após amplificação, os produtos foram submetidos á eletroforese em gel de Agarose como descrito no capítulo I (Seção secundária 3.5).

As mesmas amostras utilizadas para amplificação do gene *tuf* foram utilizadas para amplificação com o gene *16S rDNA*. As condições de reação e de amplificação foram utilizadas conforme decrito por Chen et al. (2010) com o objetivo de determinar o delineamento genotípico das amostras frente ao gene *tuf*.

3.4-Sequenciamento, análise filogenética, análise de entropia das sequências e distância média entre os clados

Os produtos da PCR com alvo nos genes *tuf* e *16S rDNA* foram purificados utilizando-seo kit Clean Sweep PCR Purification (Thermo Fisher Scientific®), e sequenciados pelo método de Sanger (SANGER et al.,1997) no equipamento ABI 3730 DNA analyzer (AppliedBiosystems®). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em ambas as direções utilizando os oligoiniciadoresdescritos acima. As sequências foram montadas e editadas utilizando o programa CLC Main Workbench v.7.9.1 (POSADA; CRANDALL, 1998) e foram depositadas no GenBank sob número de acesso para o gene *tuf* MG 833003 (*E. canis*-Baixlit) e MG 833005 para *E.canis*-Met.A ferramenta “Basic Local AlignmentSearch Tool” (BLAST) foi usada para avaliar a identidade do gene *tuf* com sequências de nucleotídeos de *E. canis* disponíveis no GenBank. As sequências obtidas neste estudo para o gene *tuf* foram alinhadas com outras sequências de gêneros e espécies de bactérias disponíveis no banco de dados “GenBank”. (Quadro 1). Utilizando a sequência *E. canis*-Oklahoma (M73221) como referência para o gene *16S rDNA* e *E. canis*-Jake (CP000107) para referência do gene *tuf*. Todos os códigos de acesso e o país de origem das sequências do gene *tuf* e do gene *16S rDNA* utilizadas para o alinhamento estão listados no quadro 1. Os alinhamentos foram realizados utilizando o algoritmo Clustal W (THOMPSON et al., 1994) disponível no software Mega 7.0 (TAMURA et al., 2013). Os agrupamentos filogenéticos foram realizados utilizando o método Máxima Verossimilhança. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para calcular a distância evolucionária para o gene *16S rDNA* e o modelo Hasegawa-Kishino-Yano com taxa Gama distributed (G) 5 para o gene *tuf*. Os modelos foram selecionados baseados em Akaike Information Criterion (AIC) utilizando o software jModelTest2 (DARRIBA et al., 2012). A combinação de clusters filogenéticos foi avaliada usando teste de Bootstrap com 1000 pseudoréplicas para testar diferentes reconstruções filogenéticas. A filogenia e as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de DNA foram transcritas e analisadas usando o programa CLC Main Workbench v.7.9.1 (POSADA; CRANDALL, 1998). Para entender o grau de variação do gene *tuf*, a entropia dos alinhamentos das sequências de aminoácidos foi calculada utilizando o software BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL et al., 1999).

Para cálculo da distância média entre os clados de ambos genes, foi utilizado o programa Mega 7.0 (TAMURA et al., 2013).

Quadro 1. Sequências de *Ehrlichia canis* dos genes *16S rDNA* e *tuf* usados na reconstrução filogenética do presente estudo disponíveis no GenBank.

<i>16S rDNA</i> (Código de acesso)	<i>tuf</i> (Código de acesso)
<i>Ehrlichia canis</i> Oklahoma EUA M73221	<i>Ehrlichia canis</i> Jake EUA CP000107
<i>Ehrlichia canis</i> Taiwan EU106856	<i>Anaplasma marginale</i> NC012026
<i>Ehrlichia canis</i> Bangkok EU263991	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> LASP0100000
<i>Anaplasma marginale</i> M60313	<i>Ehrlichia ruminantium</i> CR767821
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> DQ458808	<i>Ehrlichia muris</i> CP006917
<i>Ehrlichia ruminantium</i> NR074155	<i>Ehrlichia chaffeensis</i> NZ_CP007479
<i>Ehrlichia muris</i> NR025962	<i>Wolbachia</i> sp NC012416
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> U23503	
<i>Wolbachia</i> sp DQ402518	
<i>Ehrlichia canis</i> Brasil EF195135	
<i>Ehrlichia ewingii</i> NR044747	

4 RESULTADOS

As duas amostras oriundas da Baixada Litorânea e Metropolitana apresentaram amplificação específica para os genes *16S rDNA* e *tuf*. Devido ao alinhamento com outras sequências disponíveis no GenBank foi possível obter 1300 pb do gene *16S rDNA* e 1200 pb do gene *tuf*. Na análise de identidade do gene *tuf*, *E. canis*-Met (MG833003) e *E. canis*-BaixLit (MG833005) apresentaram variações de 86% a 100% e 86% a 99% respectivamente (100% de cobertura) quando comparados com outras espécies de *Ehrlichia* oriundas de países como Estados Unidos da América, África do Sul e Japão (sequências disponíveis no GenBank) (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação da identidade entre as amostras do gene *tuf* de *Ehrlichia canis* obtidas no presente estudo e as disponíveis no GenBank amplificadas pelo gene *tuf*

Sequências do presente estudo	Sequência do GenBank*	Identidade (%)
	<i>Ehrlichia canis</i> Jake-[CP000107]	100%
	<i>Ehrlichia chaffensis</i> [NZCP007479]	93%
<i>Ehrlichia canis</i> Met (443)	<i>Ehrlichia ruminantium</i> [CR767821]	86%
MG833003	<i>Ehrlichia muris</i> [CP006917]	92%
	<i>Ehrlichia canis</i> [Jake CP000107]	99%
<i>Ehrlichia canis</i> BaixLit (121)	<i>Ehrlichia chaffensis</i> [NZCP007479]	93%
MG833005	<i>Ehrlichia ruminantium</i> [CR767821]	86%
	<i>Ehrlichia muris</i> [CP006917]	92%

*CP000107, CP006917 e NZCP007479= Estados Unidos; CP006917= Japão; CR767821= África do Sul.

No que tange a análise de identidade utilizando o gene *16S rDNA* foram observadas variações de 97% a 99% (100% de cobertura) para ambas amostras quando comparados com outras espécies de *Ehrlichia* obtidas de países como Estados Unidos da América e África do Sul (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação da identidade entre as amostras de *Ehrlichia canis* obtidas no presente estudo e as disponíveis no GenBank amplificadas pelo gene *16S rDNA*

Sequência do presente estudo	Sequência do GenBank*	Identidade (%)
	<i>Ehrlichia canis</i> Oklahoma [M73221]	99%
	<i>Ehrlichia chaffensis</i> [U23503]	98%
<i>Ehrlichia canis</i> Met (443)	<i>Ehrlichia ruminantium</i> [NR074155]	97%
	<i>Ehrlichia muris</i> [NR025962]	97%

	<i>Ehrlichia canis</i> Oklahoma [M73221]	99%
<i>Ehrlichia canis</i> BaixLit (121)	<i>Ehrlichia chaffensis</i> [U23503]	98%
	<i>Ehrlichia ruminantium</i> [NR074155]	97%
	<i>Ehrlichia muris</i> [NR025962]	97%

* M73221, U23503, NR025962= Estados Unidos; NR074155= África do Sul.

Na análise do gene *tuf*, o perfil genético de *E. canis*- Met (MG833003) apresentou 100% de identidade quando comparada a sequência de *E. canis* de Oklahoma (M73221), considerada sequência de referência, demonstrando alto nível de conservação. Quando a sequência *E. canis*-BaixLit (MG833005) foi comparada com a sequência de Oklahoma (M73221) apresentou 99% de identidade. Na análise de agrupamento, pode-se observar a formação de dois cladogramas (Clados A e B) suportados por alto valor de Bootstrap (99%) No Clado A observamos o agrupamento de distintas espécies do gênero *Ehrlichia*. O Clado B está formado apenas por sequências do gênero *Anaplasma*, incluindo as espécies *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* (Figura 2). Quanto as amostras analisadas no presente estudo tanto *E. canis*- BaixLit como *E. canis*-Met apresentaram-se no mesmo Clado juntamente com *E. canis*-Jake (CP000107) sugerindo semelhança entre as sequências.

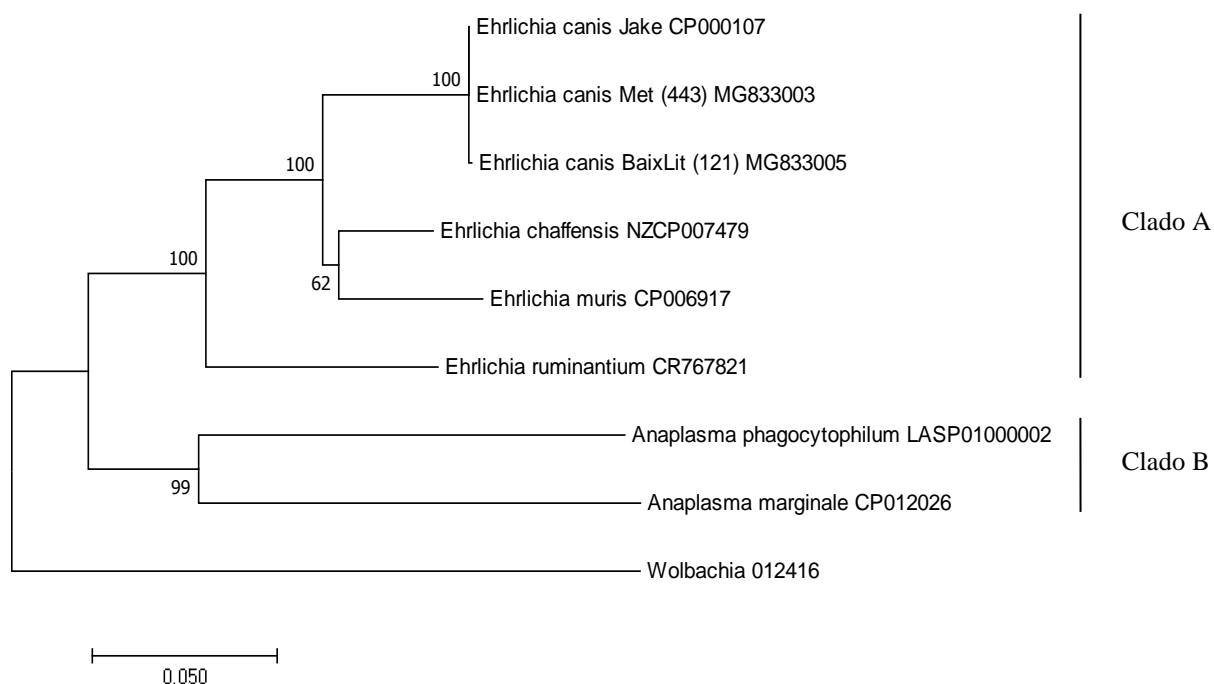


Figura 2. Dendrograma de distintos organismos da família Anaplasmataceae e amostras de *Ehrlichia canis* isolados de cães baseado na comparação de sequência do gene *tuf*. O número de acesso ao GenBank estão ao lado das sequências. O dendrograma foi construído utilizando o método Máxima Verossimilhança e o número nos nós indica um bootstrap de 1000 replicatas. *Wolbachia* sp. foi utilizada como *outgroup*.

O perfil genético das sequências de *E. canis*, baseados nas sequências do gene *16S rDNA*, foi altamente conservado. Na análise de agrupamento, pode-se observar a formação de

dois clados (Clados A e B) suportados por alto valor de Bootstrap (93%). Todas as sequências do presente estudo se agruparam no Clado A, juntamente com as sequências das outras espécies do gênero *Ehrlichia* (Figura 3). O Clado B está formado apenas por sequências de outro gênero, *A. platys* e *A. phagocytophilum* (Figura 5). Além disso, no Clado A as amostras de *Ehrlichia* do presente estudo agruparam-se com outras sequências de *E. canis* de Bangkok (EU263991), Oklahoma (M73221), Taiwan (EU106856) e Brasil (EF195135) sugerindo uma semelhança genética entre estas sequências. A distância média calculada entre as sequências do Clado A e B foi de 0,09.

A média de distância entre os clados A e B foi maior na análise do gene *tuf* (0,39) quando comparado com o gene *16S rDNA*.

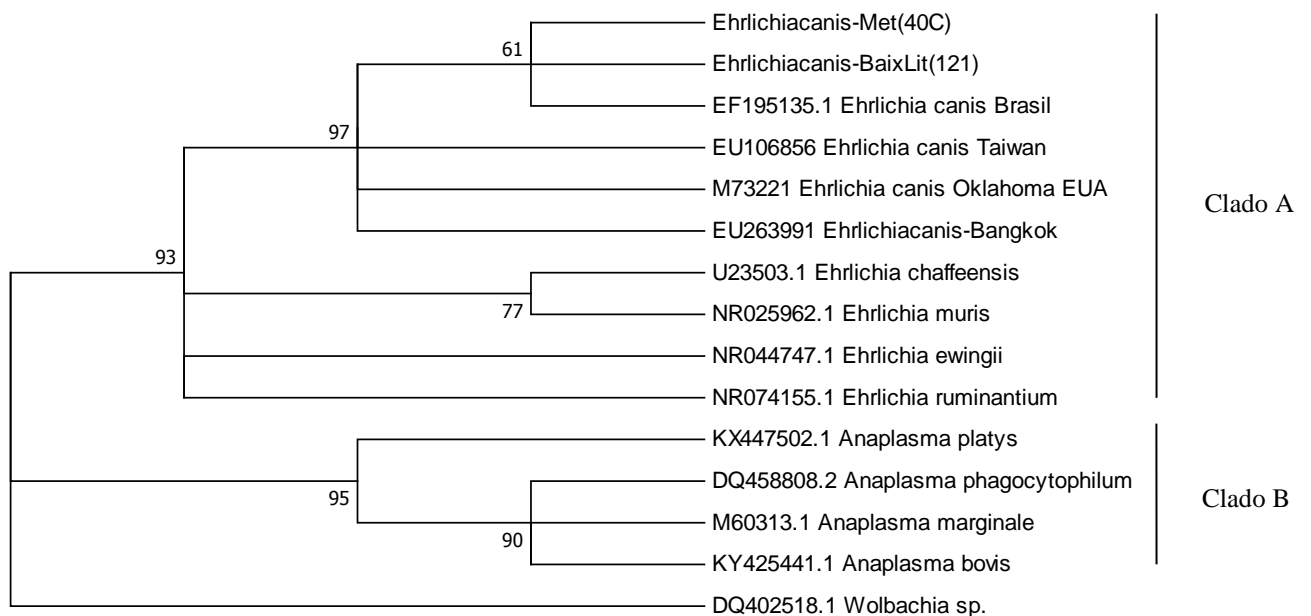


Figura 5. Dendrograma de genótipos de *Ehrlichia canis* de cães baseado na comparação de sequência do gene *16S rDNA*. O número de acesso ao GenBank estão ao lado das sequências. O dendrograma foi construído utilizando o método Máxima verossimilhança e o número presente em cada nó indica o valor de Bootstrap usando 1000 replicatas. *Wolbachia sp.* foi utilizada como “outgroup”.

A sequência de aminoácido da proteína TUF da amostra *E. canis*-BaixLit (MG833005) apresentou divergência em um nucleotídeo resultando em uma mutação não silenciosa do gene *tuf* ($G \rightarrow A$) originando a mudança na posição 347 de um aminoácido. O que proporcionou a substituição de Ácido Glutâmico (E) por Lisina (K) (Tabela 3). Esta análise foi baseada na sequência de referência Jake (CP000107).

Tabela 3. Diferenças de aminoácidos na sequência parcial do polipeptídeo deduzido a partir de TUF entre sequências de *Ehrlichia canis* obtidos de cães das mesorregiões de Baixada litorânea e Metropolitana localizadas no estado do Rio de Janeiro.

Amostras	Posição/Aminoácido	
	347	347
	RNA	Aminoácido
<i>E. canis</i> Jake (CP000107)	GAA	Ácido Glutâmico
<i>E. canis</i> BaixLit (MG833005)	AAA	Lisina

O resultado da análise da entropia dos nucleotídeos das espécies de *Ehrlichia* demonstram que o gene *16S rDNA* apresentou mais regiões conservadas quando comparadas com a análise de entropia dos nucleotídeos do gene *tuf* (Figuras 4 e 5). Na análise do gene *tuf* observamos regiões com poucas áreas de conservação, o que demonstra a utilidade do gene na diferenciação intraespecífica.

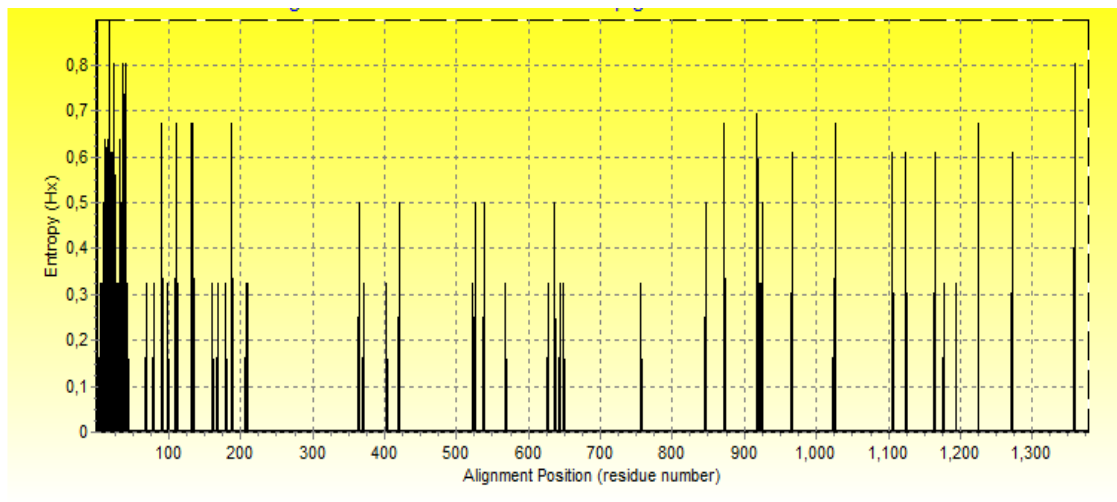


Figura 4. Gráfico de entropia do gene *16S rDNA* realizado com as espécies do gênero *Ehrlichia*. Gráfico plotado no programa BioEdit 6.0.

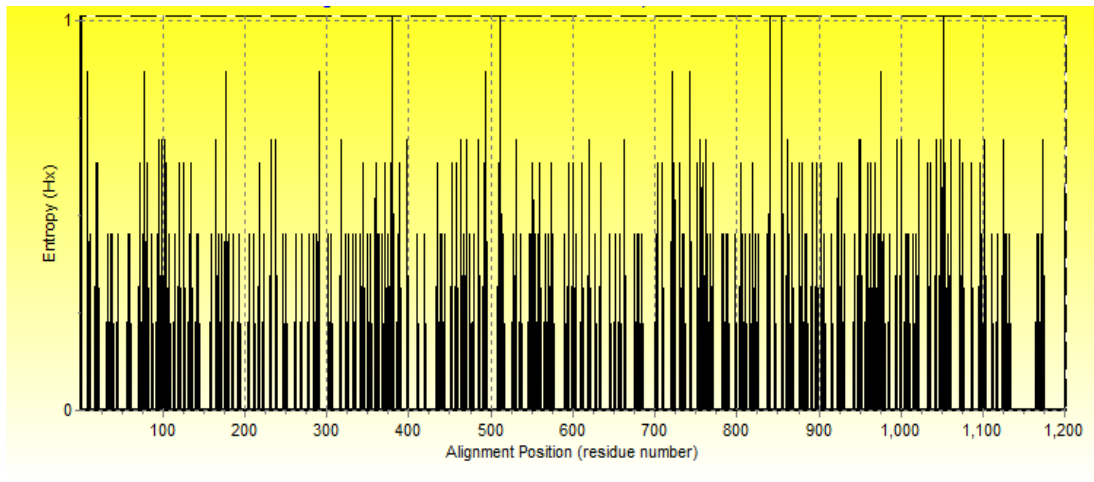


Figura 5. Gráfico de entropia do gene *tuf* realizado com as espécies do gênero *Ehrlichia*. Gráfico plotado no programa BioEdit 6.0.

5- DISCUSSÃO

Este é o primeiro ensaio com a utilização do gene *tuf* para caracterização genética de *E. canis*. O presente estudo demonstrou que este alvo pode ser uma alternativa na detecção molecular de *E. canis* em amostras de sangue obtidas de cães. Na análise do desempenho do gene *tuf* para caracterização, observamos uma menor variação intraespecífica quando comparamos com a variação interespecífica, pois ao comparar o uso do gene *16S rDNA* para fins de caracterização molecular, a variação interespecífica foi maior no gene *tuf*. Tal fato comprovou a utilidade deste gene para separar as espécies dentro do gênero *Ehrlichia*. Apesar da ampla utilização do gene *16S rDNA* para o diagnóstico de *E. canis*, este é um gene altamente conservado, demonstrando limitada variabilidade entre as sequências de uma mesma espécie, o que dificulta a diferenciação ou classificação entre espécies (OLIVE; BEAN, 1999). Em trabalho realizado por Mignard e Flandrois et al. (2007) os autores determinaram que o gene *tuf* foi uma boa ferramenta para discriminar espécies estreitamente relacionadas como *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium gastri*. Sarmiento-Rubiano et al. (2010) definiram uma nova espécie de *Lactobacillus* estreitamente relacionado com *Lactobacillus johnsonii* utilizando cinco genes, entre eles o gene *tuf*.

Trabalhos anteriores desenvolvidos por outros autores com alvo em genes como oxidoreductase (*dsb*), genes induzidos por choque térmico (*groESL*), da citrato sintase (*gltA*) além de genes de proteínas de membrana (*Anka*, *gp19*, *gp36*, *p28*) confirmam as relações entre as espécies do gênero *Ehrlichia* previamente determinadas pelo gene *16S rDNA* (MURPHY et al., 1998; OHASHI et al., 1998; DOYLE et al., 2005; ZHANG et al., 2008; CHEN et al., 2010; NAKAGHI et al., 2010; YBAÑEZ et al., 2012). Os resultados verificados no presente trabalho confirmam a eficácia da técnica quanto à detecção de *E. canis*. Contudo, não houve possibilidade de comparações com outras sequências amplificadas para o gene *tuf* devido a falta de isolados desta espécie com depósitos válidos para este gene. O perfil gênico dos produtos amplificados com alvo nos genes *tuf* e *16S rDNA* demonstraram identidade de 100% e 99% para as duas amostras respectivamente de *E. canis* das mesorregiões Baixada Litorânea e Metropolitana. Esses resultados corroboram aos encontrados por Ferreira et al. (2014) quando utilizaram o gene *16S rDNA* e encontraram variação de identidade entre 97% e 99% das sequências obtidas de cães na região metropolitana. Na análise do gene *tuf*, a amostra oriunda da mesorregião metropolitana apresentou 100% de identidade com sequência Jake-EUA (CP000107), diferente do que foi encontrado na amostra da Baixada litorânea que apresentou 99% de identidade. Esta amostra apresentou o mesmo comportamento (99% identidade) na análise do gene *16S rDNA*. Isto sugere que *E. canis*-BaixLit apresenta uma região de polimorfismo refletindo em diferença gênica significativa. Este fato foi comprovado quando foi detectada uma mutação não-sinonímia na análise dos aminoácidos deduzidos do gene *tuf*. Tal mutação refletiu na substituição de um Ácido Glutâmico (E) por uma Lisina (K). Martineau et al. (2001) consideram este gene conservado em bactéria extracelular, em estudos observaram que bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentaram uma taxa de variação de 0,6% (n=2/320) de mutação não silenciosa ao longo de 320 aminoácidos. Ao comparar resultados do presente estudo com o trabalho acima citado, observa-se que a taxa de variação de mutação não-sinonímia foi inferior ao encontrado por Martineau et al. (2001) (taxa de 0,25% (n=1/396) ao longo de 396 aminoácidos). Os fatores pelos quais tais mutações ocorreram ainda não foram estabelecidos haja vista que se trata do primeiro ensaio do gene *tuf* para bactérias intracelulares. Estudos mais aprofundados, baseados em clonagem do gene poderão gerar mais informações e assim elucidar quais fatores influenciam na variabilidade gênica em determinadas áreas do gene *tuf*. Em relação as análises de genes de superfície de membrana, sabe-se que regiões de variação podem também estar presentes na sequência de *E. canis*, Aguiar et al. (2013) e Ferreira et al. (2014) demonstraram, na análise gênica e

antigênica que existe diversidade de genes no Brasil e em específico no estado do Rio de Janeiro. A presença desta mutação pode estar relacionada a influência da grande movimentação de pessoas e de animais. Esta mesorregião é considerada área turística; os cães são considerados animais “pets” e muitas das vezes acompanham os tutores em suas viagens, favorecendo a circulação do agente devido a uma maior exposição do animal a diferentes estirpes bacterianas (CHAME et al., 2007). No entanto, são necessários mais estudos visando avaliar quais os perfis genotípicos circulantes deste agente nesta mesorregião.

6-CONCLUSÕES

O *16S rDNA* é um gene muito conservado entre a espécie *E. canis*, não sendo observado nenhum polimorfismo intraespecífico entre os genótipos circulantes da mesorregião da Baixada fluminense e da mesorregião Metropolitana.

Na análise do gene *tuf*, presente em *E. canis*, observa-se poucas regiões com áreas de conservação, o que destaca a possibilidade de sua utilização na diferenciação intraespecífica desta espécie.

A análise do gene *tuf* de *E. canis* da mesorregião da Baixada litorânea-RJ apresenta um único ponto de polimorfismo em relação ao genótipo Jake-EUA. Novos estudos são necessários para uma melhor análise deste polimorfismo em *E. canis*, tanto ao nível de outras regiões do Brasil e como também do mundo.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; ZHANG, X.; MELO, A.L.T.; PACHECO, T.A.; MENESES, A.M.C.; ZANUTTO, M.S.; HORTA, M.C.; SANTARÉM, V.A.; CAMARGO, L.M.A.; MCBRIDE, J.W.; LABRUNA, M.B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.315-321, jun. 28 2013.

ALMAZÁN, C.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V.H.; DE MERA, I.G.F.; CABEZAS-CRUZ, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R.; DE LA FUENTE, J. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.2, p.276-283, mar. 2016.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321-325, may.12 2008.

BHATTARAI, N.R.; VAN DER AUWERA, G.; KHANAL, B.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; DAS, M.S.; URANW, S.; OSTYN, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N.; PICADO, A.; DAVIES, C.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.C. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. **Tropical Medicine and International Health**, v.14, n.4, p.404-411, 2009.

BORNET, B. & BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.209-215, 2001.

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*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.9, p.2645-2651, sep.1998.

CHAME, M.; BATOULI-SANTOS, A.L.; BRANDÃO, M.L. As migrações humanas e animais e a introdução de parasitas exóticos invasores que afetam a saúde humana no Brasil. **Fundamentos**. v.7, p.47-62, 2007. Disponível em: <http://157.86.8.70:8080/certifica/handle/icict/43451>. Acessado em 05 fevereiro de 2018.

CHEN, Y.H.; LEE, C.C.; TSANG, C.L.; CHUNG, Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.70-75, nov.20 2010.

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

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

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D.J. Model Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat. Methods**, v.30, p.772, 2012.

DENIAU, M.; CAÑAVATE, C.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; MARTY, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.97, n.1, p.15-33. 2003.

DÍAZ-REGAÑÓN, D.; VILLAESCUSA, A.; AYLLÓN, T.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; BANETH, G. CALLEJA-BUENO, L.; GARCÍA-SANCHO, M.; AGULLA, B.; SAINZ, Á. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. **Parasit Vectors**, v.10, n.1, p.112.2017.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une *Rickettsia* du chein. **Bull Soc. Pathol. Exot.**, v.28, p.418-419. 1935.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p.504-510, 2005.

DUMLER J.S.; BARBET A.F.; BEKKER C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, p.2145-65, nov.2001.

GOLDMAN, E.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; GRINDEM, C.B.; HEGARTY, B.C.; WALLS, J.J.; DUMLER, J.S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v.12, n.2, p.61-70, mar-apr. 1998.

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

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J.E.; POLAND, A.M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.1, p.73-6, jan.1998.

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

HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiol Immunol.**, v.44, n.9, p.737-9, 2000.

HUANG, C.H.; CHANG, M.T.; HUANG, L.; CHU, W.S. Utilization of elongation factor Tu gene (*tuf*) sequencing and species-specific PCR (SS-PCR) for the molecular identification of *Acetobacter* species complex. **Mol. Cell Probes.**, v.28, n.1, p.31-3, feb.2014.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br> Último acesso em 05 de fevereiro de 2018.

- INOKUMA, H.; TERADA, Y.; KAMIO, T.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Analysis of the 16SrRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. **Clin.Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, p.241-244, 2001.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1658-1662, jul.1994.
- KAMANI, J.; LEE, C.C.; HARUNA, A.M.; CHUNG, P.J. WEKA, P.R.; CHUNG, Y.T. First detection and molecular characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Nigeria. **Res. Vet. Sci.**, v.94, n.1, p.27-32, feb.2013.
- LAFONTAINE, D.L.J.; TOLLERVEY, D. The function and synthesis of ribosomes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2, p.514–520, jul.2001
- MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; DANBING, K.E.; PARADIS, S.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2541–2547, jul.7 2001.
- MCBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; GEOFFREY, J.C.; AKITA, Y.; OSBURN, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet.Diagn.Invest.**, v.8, p.441-447, oct.1996.
- MITTAL, M.; KUNDU, K.; CHAKRAVARTI, S.; MOHAPATRA, J.K.; NEHRA, K.; SINHA, V.K.; SANJEETH, B.S.; CHURAMANI, C.P.; KUMAR, A. Canine Monocytic Ehrlichiosis among working dogs of organised kennels in India: A comprehensive analyses of clinico-pathology, serological and molecular epidemiological approach. **Prev. Vet.Med.**, v.1, n.147, p.26-33, nov.1 2017.
- MONTENEGRO, V.M.; BONILLA, M.C.; KAMINSKY, D.; ROMERO-ZÚÑIGA, J.J.; SIEBERT, S. KRAMER, F. Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. **Vet.Parasitol.**, v.15, n.236, p.97-107.2017.
- MRLJAK, V.; KULES, J.; MIHALJEVIC, Z.; TORTI, M.; GOTIC, J.; CRNOGAJ, M.; ZIVICNJAK, T.; MAYER, I.; SMIT, I.; BHIDE, M. BARIC RAFAJ, M. Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.7, n.6, p.398-408, jun.2017.
- MURPHY G.E., EWING S.A., WHITWORTH L.C., FOX J.C.; KOCAN A.A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, v.79, p.325-339, nov.27 1998.
- NAKAGHI, A.C.H; MACHADO, R.Z.; FERRO, J.A.; LABRUNA, M.B.; CHRYSAFIDIS, A.L.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, Jaboticabal.v.19, p.75-79, apr-jun.2010.

O'DUSHLAINE, C.T.; SHIELDS, D.C. Tools for the identification of variable and potentially variable tandem repeats. **BMC Genomics**, v.15, n.7, p.290, nov.15 2006.

OHASHI, N.; UNVER, A.; ZHI, N.; RIKIHISA, Y. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. **J.Clin.Microbiol.**, v.36, n.9, p.2671-80, sep.1998.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.6, p.1661-9, jun. 1999.

PALMER, S.O.; RANGEL, E.Y., MONTALVO, A.E.; TRAN, A.T.; FERGUSON, K.C.; BULLARD, J.M. Cloning and characterization of EF-Tu and EF-Ts from *Pseudomonasaeruginosa*. **Biomed Res. Int.**, v.2013, p.1-12, 2013.

POSADA, D., CRANDALL, K.A., Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**. V. 14, p. 817–818, 1998.

RODGERS, S.J.; MORTON, R.J.; BALDWIN, C.A. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p.154-159, apr.1989.

ROMERO, L.E.; MENESES, A.I.; SALAZAR, L.; JIMÉNEZ, M.; ROMERO, J.J.; AGUIAR, D.M.; LABRUNA, M.B.; DOLZ, G. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. **Res. Vet.Sci.**, v.91, n.1, p.95-7, aug.2011.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** v.74, p.5463-5467, dec.1977.

SUH, G.H.; AHN, K.S.; AHN, J.H.; KIM, H.J.; LEUTENEGGER, C.; SHIN, S. Serological and molecular prevalence of canine vector-borne diseases (CVBDs) in Korea. **Parasit Vectors**, v.10, n.1, p.146, mar.16 2017.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **J.Clin.Microbiol.**, v.39, n.1, p.90-3, jan.2001.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** V. 11:22, p. 4673–4680, 1994.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet.Parasitol.**, v.140, p.223-230, sep.10 2006.

VAN BELKUM, A.; SHERER, S.; VAN ALPHEN, S.; VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, n.2, p.275-93, jun. 1998.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; MEYLAN, V.; KLAENHAMMER, T.R.; ZINK, R. Analysis, characterization, and loci of the tuf genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n.11, p.6908-22, nov.2003.

VIEIRA, R.F.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.; DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.; DE MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.20, n.1, p.1-12, jan-mar. 2011.

WEN, B.; ZHANG, Y.; CHEN, R. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.9, p.3286-90, sep.2002.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; BANETH, G.; MIYASHIRO, S.; STRENGER, C.; WANER, T.; MCBRIDE, J.W. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.15, n.7, p.1080-1088, jul.2008.

ZHANG, X.; LIU, Q.; WANG, D.; LI, W.; BEUGNET, F.; ZHOU, J. Epidemiological survey of ticks and tick-borne pathogens in pet dogs in south-eastern China Jianwei. **Parasite**, v.24, p.35. 2017.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO CITOLÓGICA, MOLECULAR E ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE DNA DE *Ehrlichia canis* EM CÃES DAS MESORREGIÕES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

COSTA, Renata Lins. **Avaliação citológica, molecular e análise dos fatores associados à presença de DNA de *Ehrlichia canis* em cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.** 2018. 24 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Este estudo objetivou analisar a frequência de *Ehrlichia canis* nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, bem como avaliar possíveis fatores associados a positividade de *E. canis*. Foram obtidas 267 amostras de sangue de cães das mesorregiões Norte, Noroeste, Baixada Litorânea e Metropolitana. Das mesorregiões Sul e Centro fluminense foram obtidas de Organizações Não Governamentais (ONGs), do Rio de Janeiro. As amostras de sangue, coletadas de março de 2014 a abril de 2017, foram acondicionadas em tubos estéreis contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e encaminhada ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos, corados pelo método de Romanowsky -Giemsa para posterior análise citológica. As amostras foram também alíquotadas e submetidas a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) para posteriores análises moleculares. Para detecção de *E. canis*, realizou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com alvo em 414 pares de base (pb) do gene *gp19*. Em seguida, as amostras positivas na citologia e negativas na PCR para *E. canis* foram submetidas a duas reações distintas de PCR em tempo real (qPCR), sendo uma com alvo no gene *gltA* específico para *Anaplasma platys*, e outra no gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*. Utilizou-se o teste de McNemar, para comparar a frequência de *E. canis* obtidas através da PCR e da citologia, analisando os pares discordantes entre os diagnósticos, a 5% de significância. Para a análise dos fatores associados a positividade de *E. canis*, avaliou-se a influência do sexo e da raça dos cães frente a frequência de positivos, através do teste Qui-quadrado e Exato de Fisher ($p < 0,05$). Foi observado que pelo menos uma amostra de cada mesorregião do estado do Rio de Janeiro foi detectada a presença de DNA de *E. canis*, através da PCR. Das 267 amostras analisadas, 54,68% ($n=146/267$) apresentaram inclusões basofílicas em monócitos, sugestivas de parasitismo, na avaliação do esfregaço sanguíneo. Além disso, observou-se que 43,82% ($n=117/267$) do total de amostra analisadas apresentaram amplificação do fragmento do gene *gp19* de *E. canis*. Observou-se que 68,49% ($n=100/146$) das amostras que continham inclusões em monócitos também apresentaram positividade para *E. canis* no diagnóstico molecular. Foi observado discordância significativa entre os resultados obtidos através das técnicas utilizadas nesse estudo ($p=0,0004$). Dentre as 46 amostras que foram consideradas negativas na análise molecular para *E. canis*, 10,8% ($n=5/46$) foram positivas para *A. platys* e nenhuma foi considerada positiva para *A. phagocytophilum*. O sexo e a raça não foram fatores associados ($p > 0,05$) a presença de DNA de *E. canis* em cães neste estudo. A detecção de *E. canis* em cães localizados nas seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, bem como a análise das técnicas de diagnóstico atuais, e os possíveis fatores associados ao seu parasitismo, tornam-se ferramentas úteis no conhecimento da Erliquiose Monocítica Canina presente neste estado.

Palavras-chave: Doença do carrapato; diagnóstico; epidemiologia.

ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. **Cytological, molecular and analysis of factors associated with *Ehrlichia canis* infection from dogs from the mesoregions of the state of Rio de Janeiro.** 2018. 24p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

This study aimed to perform an analysis of the distribution of *Ehrlichia canis* in the mesoregions of the state of Rio de Janeiro as well as to evaluate the possible factors associated with *E. canis*. The 267 samples were obtained from clinical pathology laboratories and from Non-Governmental Organizations (NGOs) of the South, North and Northwestern, Coastal Baixada and Metropolitan regions of the state of Rio de Janeiro. The blood samples were conditioned in sterile tubes containing anticoagulant to the Laboratory of Hemoparasites and Vectors of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (LHV). In the LHV were made blood smears, with Romanowsky-Giemsa staining method, for cytology. The samples were aliquoted and extracted with commercial kit (Promega®) for further molecular analysis. For detection of *E. canis*, a target of 414 bp of the *gp19* gene was used. For the differential diagnostic, a target of 84 bp of *gltA* gene from *Anaplasma platys* and 122 pb for the *msp2* gene of *Anaplasma phagocytophilum* was searched by two Real-time PCR (qPCR) reactions. Statistical analysis of discordant pairs was performed using the McNemar test ($p < 0.05$), and the Chi-square test ($p < 0.05$) was used to analyze the possible factors associated with *E. canis* parasitism. All analyzes were performed using the BioEstat 5.0 program. Through molecular analysis, *E. canis* was detected in dogs from all mesoregions of the state of Rio de Janeiro. Of the 267 analyzed samples, 54.68% ($n = 146/267$) presented basophilic inclusions suggestive of parasitism in monocytes in the evaluation of the blood smear. Among the total analyzed samples, 43.8% ($n = 117/267$) presented amplification to 414 bp of the glycoprotein *gp19* gene, which demonstrated a disagreement between the results of the two techniques ($p = 0.0004$). It was observed that 37.45% ($n = 100/267$) of samples containing monocyte inclusions also showed positivity for *E. canis* in molecular diagnosis. However, from 146 samples that found basophilic inclusions in monocytes, 31.5% ($n = 46/146$) were negative for *E. canis* in the PCR. Of the 46 samples that were considered negative for amplification of a 414 bp fragment of the *gp19* gene specific for *E. canis*, it was determined that in 10.8% ($n = 5/46$) of the samples it was possible to detect a fragment of 84 pb of the gene *gltA* specific for *A. platys*, all belonging to the Metropolitan mesoregion. For the *msp2* gene, among the 46 samples analyzed, it was not possible to detect the amplification of the target DNA of *A. phagocytophilum* through the qPCR. Among the 117 animals in which *E. canis* DNA was detected, 60.68% ($n = 71/117$) belonged to Metropolitan mesoregion, 12.82% ($n = 15/117$) to South Fluminense, 14.52% ($n = 17/117$) to Northern Fluminense, 5.12% ($n = 6/117$) Center Fluminense, 4.27% ($n = 5/117$) to Northwest Fluminense and 2.56% ($n = 3/117$) to Coastal Baixada. It was observed that race and gender had no association ($p > 0.05$) with *E. canis* positivity in the analyzed samples. The analysis of the distribution of *E. canis* as well as the study of the possible associated factors with parasitism by *E. canis* in the state of Rio de Janeiro, were considered excellent tools for the knowledge of the current epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis.

Keywords: Tick-borne disease; diagnosis; epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC) e constitui a doença infecciosa dos cães mais frequentemente detectada na rotina clínica. Esta bactéria, transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (*s.l.*) no momento do repasto sanguíneo, possui tropismo por células do sistema fagocítico mononuclear. Como características de parasitismo apresentam-se em forma de mórulas em monócitos de cães infectados (WELLMAN et al., 1988; ZWEYGARTH et al., 2014). *Ehrlichia canis* apresenta ampla distribuição, e em avaliações sorológicas, países como Senegal, Tunísia, Israel, Estados Unidos, Espanha, Egito e Suíça já detectaram anticorpos anti-*E. canis* (PARZY et al., 1991; BROUQUI et al., 1991; BANETH et al., 1996; MURPHY et al., 1998; SÁINZ et al., 1995; BOTROS et al., 1995; PUSTERLA et al., 1998). No Brasil, Costa et al. (1973) identificaram os primeiros sinais clínicos da EME em cães no estado de Minas Gerais. Em 1976 ocorreu a primeira descrição da doença no Rio de Janeiro e posteriormente em 1985 na cidade de Santa Maria (Rio Grande do Sul) (ALMOSNY, MASSARD, 2002). Ao longo de quase 33 anos esta hemoparasitose se disseminou por todo Brasil, constituindo o diagnóstico mais frequente na rotina da clínica de pequenos animais. A porcentagem de animais com anticorpo anti-*E. canis* no Brasil varia de 64,7% até 80% (VIEIRA et al., 2011; VIEIRA et al., 2013).

Em avaliações citológicas, a positividade para *E. canis* em cães no estado do Rio de Janeiro variaram de 4,8% a 13,89% (ACETTA et al., 2008; ALBERNAZ et al., 2011) desde áreas rurais a urbanas. Em análises moleculares estudos comprovaram positividade de 5 a 32% na região metropolitana do Rio de Janeiro (MACIEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2014). Por *E. canis* causar uma doença altamente variável e multissistêmica, se torna difícil o estabelecimento de um diagnóstico definitivo. O padrão-ouro para diagnóstico é baseado na sorologia, utilizando-se reação de imunofluorescência indireta (IFI) (CDC, 2016). Outros testes sorológicos como ELISA, dot-Elisa e Western Immunoblotting (BARTSCH, et al., 1996; WANER et al., 2001; MORAIS, 2004) também são utilizados. Outras ferramentas como a citológica e a molecular também estão sendo utilizadas frequentemente (MURPHY et al., 1998; DOYLE et al., 2005; BANETH et al., 2010). Com relação à citologia, a visualização de uma mórula intracitoplasmática em monócitos já é sugestiva de parasitismo por *E. canis*, sendo utilizado muitas vezes como triagem na detecção do agente (HILDEBRANDT, 1973). Os objetivos do presente estudo incluíram: avaliar a presença de *E. canis* em amostras de sangue de cão através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e citológica; avaliar os fatores associados à positividade de *E. canis* em amostras de sangue de cães oriundos das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distribuição mundial

Quanto à distribuição geográfica de *E. canis*, estudos reportaram a ocorrência de cães soropositivos no Japão (INOKUMA et al., 2006), Zimbábue (KELLY et al., 2004), Camarões (NDIP et al., 2005), Costa do Marfim e Gabão (DAVOUST et al., 2006), Tunísia, Senegal e Chade (BROUQUI et al., 1991) e Sudão (INOKUMA et al., 2006). Na Europa, a investigação soroepidemiológica apontou que áreas que fazem fronteira com o mar Mediterrâneo, como Espanha, Sul da França e Turquia foram os locais em que apresentaram maior positividade (TROTZ-WILLIAMS; TREES, 2003). No continente Americano, há relatos de sororeatividade para *E. canis* em países da América do Norte como Estados Unidos e em baixa soroprevalência no Canadá (MURPHY et al., 1998; GARY et al., 2006). Na América, a detecção foi realizada no México, em clínicas veterinárias em Yucatán (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005) e em Aruba (BOOL; SUTMOLLER, 1957). E na América do Sul, países como a Argentina (EIRAS et al., 2013), Chile (LÓPEZ et al., 1999), Colômbia (YARSE, OSORIO, ARIAS, 2015) e Brasil (LABARTHE et al., 2003).

2.2 Distribuição de *Ehrlichia canis* no Brasil

A investigação soroepidemiológico-molecular de animais positivos para *E. canis* tem sido cada vez mais frequente. Na região sudeste do Brasil a variação encontrada é de 5,7% (MACIEIRA et al., 2005 (PCR); FARIA et al., 2010) a 92,3% (OLIVEIRA et al., 2000; COSTA JR et al., 2007) em animais atendidos em hospitais veterinários do Rio de Janeiro e São Paulo. Em Minas Gerais, através de citologia, a positividade pode chegar a 16% (SOARES et al., 2006), quando avaliamos as regiões de clima pouco mais frio observamos significativa diminuição da circulação do agente. No Sul do Brasil a positividade varia de 0,7% a 22,8% (LABARTHE et al., 2003 (ELISA); TRAPP et al., 2006; SAITO et al., 2008). Nas regiões norte e nordeste variam de 7% a 38% (AGUIAR et al., 2007; CARLOS et al., 2007; CARVALHO et al., 2008).

2.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da EMC é baseado no conjunto de alterações clínicas e hematológicas associados a testes laboratoriais, tais como sorológico, diagnóstico direto e molecular. Na rotina clínica, os médicos veterinários levam em consideração o valor da contagem de plaquetas, pois um dos principais sinais da erliquiose é a trombocitopenia (MENDONÇA et al., 2005). No entanto, outros fatores podem predispor o animal a desenvolver trombocitopenia, sendo esta portanto, uma ferramenta de baixa especificidade. Além do mais em estudos conduzidos, por meio de PCR, por Macieira et al. (2005), Bula et al. (2004) e Santos et al. (2009) determinaram que mesmo em animais não trombocitopênicos foi possível detectar positividade nos animais para *E. canis*.

A identificação direta realizada por citologia (esfregaço sanguíneo), tem sido muito utilizada como ferramenta de triagem (BAIN, 2005). Esta técnica é simples e barata, porém apresenta baixa sensibilidade acarretando em resultados falso-positivos. Dentre estes fatores, ressaltamos a inobservância de mórulas, baseando-se muitas vezes na observação de monócitos ativados. Além disso, os autores também ressaltam o período de incubação relativamente curto (48-96 h), refletindo na transformação lenta de corpos elementares em

mórulas que normalmente ocorre de 12 a 17 dias (MYLONAKIS et al., 2003). Os valores encontrados em amostras de esfregaços sanguíneos podem ser inferiores aos encontrados através de outras técnicas de diagnóstico, pois em infecções sub agudas ou crônicas, a parasitemia é muito baixa (ALMOSNY et al., 1998, CASTRO et al., 2004, MOREIRA et al., 2005). Além disso, corpúsculos de inclusão em monócitos muitas vezes estão relacionados à ativação do processo inflamatório podendo gerar falso diagnóstico de mórulas de *E. canis*. Dentre estes fatores ainda há a possibilidade de infecções por outros organismos da família Anaplasmataceae, como *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* que também formam inclusões citoplasmáticas (RIKIHISA et al, 2000; FERREIRA et al, 2007).

Testes sorológicos, baseiam-se na detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis*. A reação de imunofluorescência indireta (IFI) tem sido o método mais amplamente utilizado no diagnóstico de infecção por *E. canis*, e é atualmente considerado padrão-ouro de diagnóstico (ORIÁ et al., 2001; ANDRÉ et al., 2003; CDC, 2016). Outros testes como ELISA e Dot-blot-ELISA também estão sendo utilizados. Recentemente, na rotina clínica tem-se utilizado o Dot-blot-ELISA. O teste baseia-se na detecção dos anticorpos da classe IgG específicos para o agente infectante e tem demonstrado 97,9% de especificidade (PARZY et a., 2006). No entanto, a presença de reação cruzada com outros organismos filogeneticamente relacionados interfere muito em um resultado preciso e específico (MURPHY et al., 1998).

A investigação molecular também é utilizada como ferramenta de diagnóstico. Muitos estudos têm utilizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) para análises epidemiológicas e de caracterização molecular. Basicamente, a técnica consiste em detectar um fragmento do DNA-alvo do parasito em uma amostra biológica do hospedeiro vertebrado ou invertebrado. As vantagens desta técnica é que podemos detectar o DNA do parasito antes da produção de anticorpos, apresenta alta sensibilidade e especificidade além de se determinar o número de cópias do parasito numa determinada amostra. Desta forma, diversos são os trabalhos que utilizam esta ferramenta para diagnóstico e tipificação molecular parasitária inclusive para detecção de níveis muito baixos de *E. canis* (IQBAL; RIKIHISA, 1994). Todas as variantes da PCR, associadas a diversos genes tem contribuído para o conhecimento genético de *E. canis* (MURPHY et al., 1998; DOYLE et al., 2005; BANETH et al., 2008; ZHANG et al. 2008; CHEN et al., 2010).

2.4 Outros hospedeiros mamíferos

A presença de *E. canis* em outros animais já foi descrita. Alguns pesquisadores observaram infecções naturais ou experimentais em animais vertebrados além de cães domésticos. Há evidências de que os canídeos selvagens como lobos, raposas e coiotes são suscetíveis a infecção por *E. canis* (EWING et al., 1964; AMYX, HUXSOLL, 1973; Harvey et al., 1979). Outros animais como capivara, cervo e lêmures (DAWSON et al., 1994; LABRUNA et al., 2007; YABSLEY et al., 2004) também já foram investigados sorologicamente e molecularmente constatando a presença da bactéria.

A erliquiose felina tem sido cada vez mais reconhecida mundialmente desde o primeiro caso na França (CHARPENTIER, GROULADE, 1986). Outros países como EUA, Tailândia e Espanha também já relataram a circulação do agente em felinos domésticos e selvagens (BREITSCHWERDT et al. 2002; AGUIRRE et al., 2004; ORTUNO et al., 2005). No entanto, parece que há pelo menos duas bactérias, comuns em cães, em felídeos domésticos, uma atribuída a *E. canis*, com inclusões em monócitos e a outra associada a *A. phagocytophilum*, com inclusões em neutrófilos (FOLEY et al., 1999; LAPPIN et al., 2004). A sintomatologia clínica em gatos é semelhante a encontrada em cães (TARELLO, 2005). Em humanos na Venezuela, surgiu uma suspeita que *E. canis* possa estar parasitando humanos. Os pesquisadores a nomearam de *Ehrlichia Humana Venezuelana* (EHV), este sequência

apresentou 99% de identidade com sequência de *E. canis* pela análise da sequência do gene *16S rDNA*, no entanto mais estudos são necessários para determinar se as sequências pertencem à mesma espécie (PEREZ et al., 2006).

2.5- Fatores associados a positividade de cães à *Ehrlichia canis*

Quanto aos fatores associados à positividade em cães, podemos observar que o sexo parece não ter importância epidemiológica na infecção por este hemoparasito conforme relataram Baneth et al. (1996) e Sainz et al. (1996). Silva et al. (2012) observaram que não houve associação significativa entre a infecção por *E. canis* e o sexo dos indivíduos através de diagnóstico sorológico, enquanto estudos utilizando métodos moleculares em Ilhéus e Itabuna, Bahia (CARVALHO et al., 2008) também não encontraram essa associação. Esse padrão também foi observado com avaliações sorológicas realizadas em outras cidades brasileiras: Monte Negro, Rondônia, Patos, Paraíba (AGUIAR et al., 2007; AZEVEDO et al., 2011), e em cidades do sul (SAITO et al., 2008). Resultados semelhantes foram obtidos nos EUA (RODGERS et al., 1989), Israel (HARRUS et al., 1997), e no Japão (INOKUMA et al., 1999).

Com relação à raça, observa-se que este pode ser um fator associado à infecção por *E. canis*, uma vez que animais de raça apresentam como fator predisponente diferenças na capacidade de estabelecer uma resposta imune celular ou humoral. Há relatos que a resposta imune celular contra *E. canis* seja mais fraca em cães de raça, estes resultados sugerem que a resposta imune celular é um componente importante para o sistema imunitário, proporcionando assim proteção contra *E. canis* (RISTIC, HOLLAND 1993; HARRUS et al. 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo e coleta de amostras

O estudo foi realizado a partir de amostras de sangue total obtidas de cães naturalmente infectados das seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Estas mesorregiões são classificadas, segundo IBGE (2010), como: Metropolitana (Met), Norte Fluminense (NorFlu), Noroeste Fluminense (NoroFlu), Baixada Litorânea (BaixLit), Centro Fluminense (CenFlu) e Sul Fluminense (SulFlu). As amostras das quatro primeiras regiões foram obtidas de parcerias com laboratórios de Patologia Clínica e das regiões Centro e Sul Fluminense foram obtidas de Organizações Não-Governamentais (Ongs) (Figura 1).

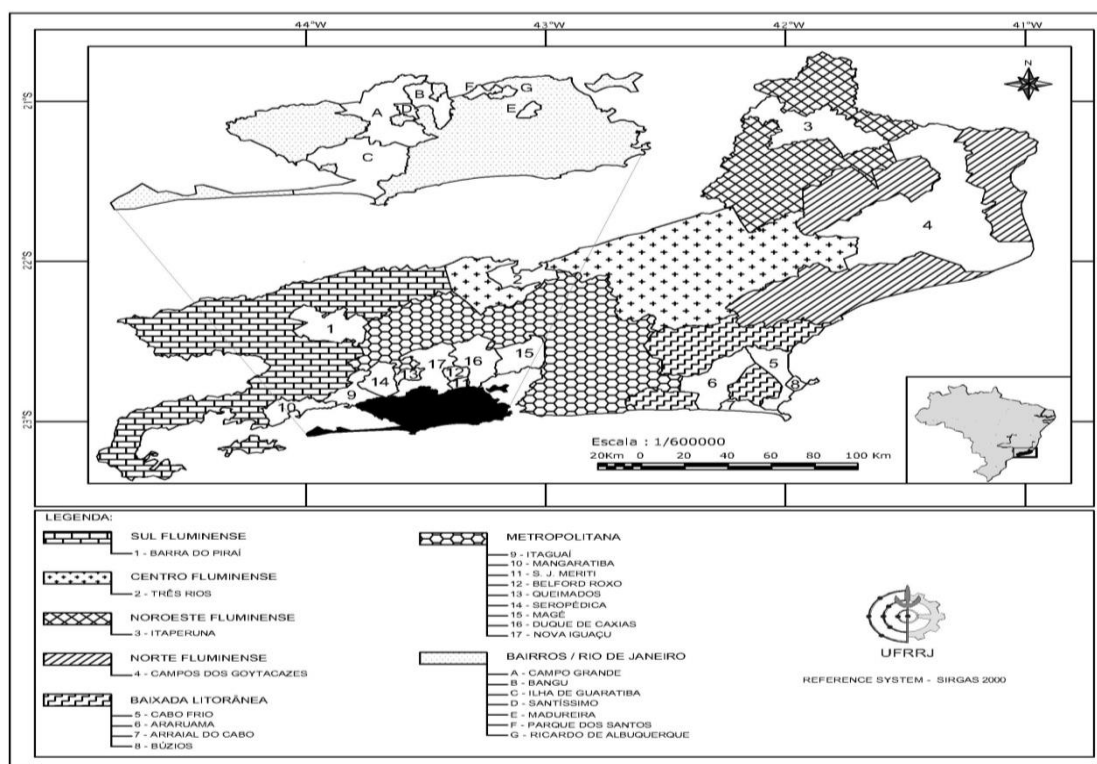


Figura 1. Localização geográfica das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, evidenciando as mesorregiões em que foram obtidas as amostras de sangue de cães.

Para a determinação do tamanho da amostra de cães foi estabelecido o grau de confiança de 95%, prevalência esperada de 16% (MACIEIRA et al., 2005) e margem de erro de 5%. O número mínimo de amostras de cães a serem coletadas nas mesorregiões foi de 206, segundo a equação descrita por Sampaio (2002).

$$n = \frac{1,9622 \times Pesp (1 - Pesp)}{d_2^2}$$

onde: n = tamanho da amostra; Pesp = prevalência esperada; d₂ = precisão absoluta desejada.

A amostragem foi realizada de forma não probabilística. Foram obtidas amostras de sangue por venopunção cefálica de cada animal, e em seguida alocados em tubos contendo o

anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), armazenados em recipiente refrigerado e transportado ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para posterior análise.

3.2 Análise citológica

As amostras de sangue coletadas nesse estudo foram utilizadas para a confecção de esfregaços sanguíneos. Essas lâminas foram fixadas em metanol, coradas pelo método de Romanowsky-Giemsa, e submetidas à microscopia óptica com objetiva de imersão (1000x) para possibilitar a visualização direta de inclusões em monócitos. Aproximadamente 100 campos foram avaliados por lâmina.

3.3 Análise molecular

Para análise molecular, realizou-se a extração de DNA com kit comercial (Promega®), seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop2000®) e avaliadas quanto ao grau de pureza do DNA. As amostras foram diluídas em alíquotas de forma que apresentassem concentração de até 100 ng/μL. Estas amostras foram congeladas em freezer a -20 °C até o momento das análises moleculares. Posteriormente, as amostras de DNA obtidas dos sangues dos cães foram analisadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com alvo na amplificação de um fragmento de 414 pares de base (bp) do gene *gp19* da espécie *E. canis*. Os oligoiniciadores utilizados foram: *gp19F* (5'-ATTAGTGTGTTGGTTATGCAA-3') e *gp19R* (5'-TACGCTTGCTGAATATCATGA-3') (CHEN et al., 2010). O volume final da reação foi de 25 μL contendo: 12,5 μL de AmplitaqGold®, 0,6mM de cada oligoiniciador e 300ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 94 °C por 3 min seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, e 72 °C por 1,3 min, seguidos por 5 min a 72 °C para extensão final. Após amplificação, os produtos foram submetidos á eletroforese em gel de Agarose como descrito no capítulo I (Seção secundária 3.5).

As amostras consideradas positivas na citologia e negativas na PCR para *E. canis* foram submetidas à amplificação de DNA de *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocitophilum*. Para amplificação de 84 pb do gene *gltA* de *A. platys*, utilizou-se a reação e as condições de termociclagem estabelecidas por Silva et al. (2016). Para amplificação de um alvo de 122 pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum*, utilizaram-se as condições de reação e termociclagem determinadas por Drazenovich et al. (2006) e Santos et al. (2011). As amostras foram consideradas positivas com Cq < 40 ciclos.

3.4 Obtenção de informações sobre gênero e raça dos animais

No momento da obtenção das amostras, foram coletadas informações sobre as características de cada cão no intuito de relacionar os possíveis fatores associados à soropositividade desses animais. Os proprietários receberam informações breves a respeito do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (AnexoII). Em todas as visitas ficou claro que a obtenção das amostras não acarretaria em ônus para os criadores. As características acima discriminadas foram analisadas considerando as seguintes variáveis: a) Gênero (macho e fêmea) e b) Raça (Com raça definida e Sem raça definida).

As conformidades éticas estão descritas no capítulo I (Seção secundária 3.7).

3.5 Análise Estatística

Para comparar as técnicas utilizadas para o diagnóstico de *E. canis* foi adotado teste de McNemar, com o objetivo de medir as proporções de discordância entre a PCR e a citologia. A análise dos resultados (pares discordantes) entre as técnicas foi realizada ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Questões inerentes ao animal como gênero e raça, foram adquiridas a partir de preenchimento cadastral. Em seguida estes dados foram tabulados a fim de avaliar os possíveis fatores associados a positividade de cães à *E. canis*. Com o objetivo de avaliar a associação entre essas variáveis e a positividade foi realizado o teste de Qui-quadrado e ou exato de Fisher, sendo considerada associação significativa ao nível de 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES, 2007).

4 RESULTADOS

Através de análise molecular, *E. canis* foi detectado em cães de todas as mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Cento e dezessete das 267 amostras de sangue de cães (43,82%) mostraram uma amplificação específica para o gene *gp19* de *E. canis* quando testadas usando a PCR (Figura 2).

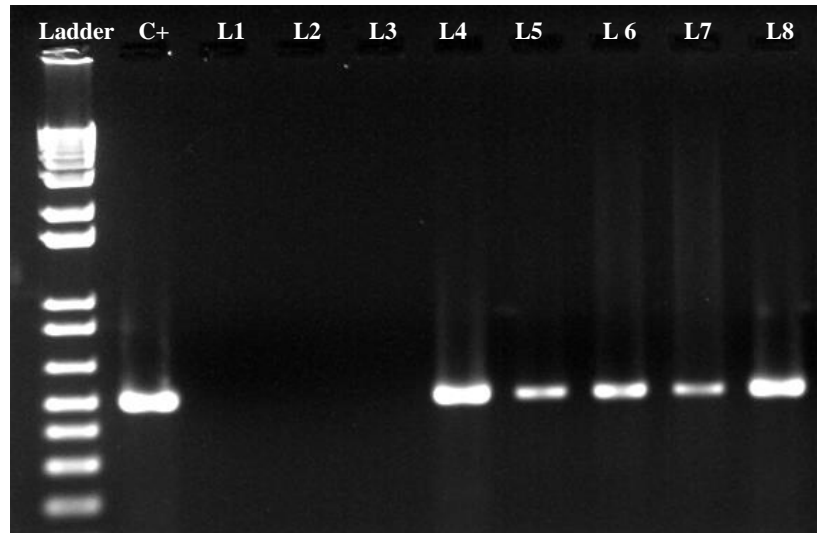


Figura 2. Gel de Agarose a 1,5% corado com Brometo de etídio contendo amostras de DNA negativas (L1-L3) e positivas (L4-L8) para um fragmento de 414 pb do gene *gp19* de *Ehrlichia canis* amplificados durante a PCR convencional. Ladder= Marcador molecular de 1kb (Invitrogen®); C+= Controle positivo.

Das 267 amostras analisadas, 54,68% (n=146/267) apresentaram inclusões basofílicas sugestivas de parasitismo em monócitos na avaliação do esfregaço sanguíneo (Figura 3). No entanto, entre essas amostras 43,8% (n=117/267) apresentaram amplificação para 414 pb do gene codificador da glicoproteína *gp19* (Figura 3), o que demonstrou discordância entre os resultados das duas técnicas (p=0,0004) (Tabela 1).

Observou-se que 68,49% (n=100/146) das amostras que continham inclusões em monócitos também apresentaram positividade para *E. canis* no diagnóstico molecular. Contudo, das 146 amostras onde foram encontradas inclusões basofílicas em monócitos, 31,5% (n=46/146) foram negativas para *E. canis* na PCR.

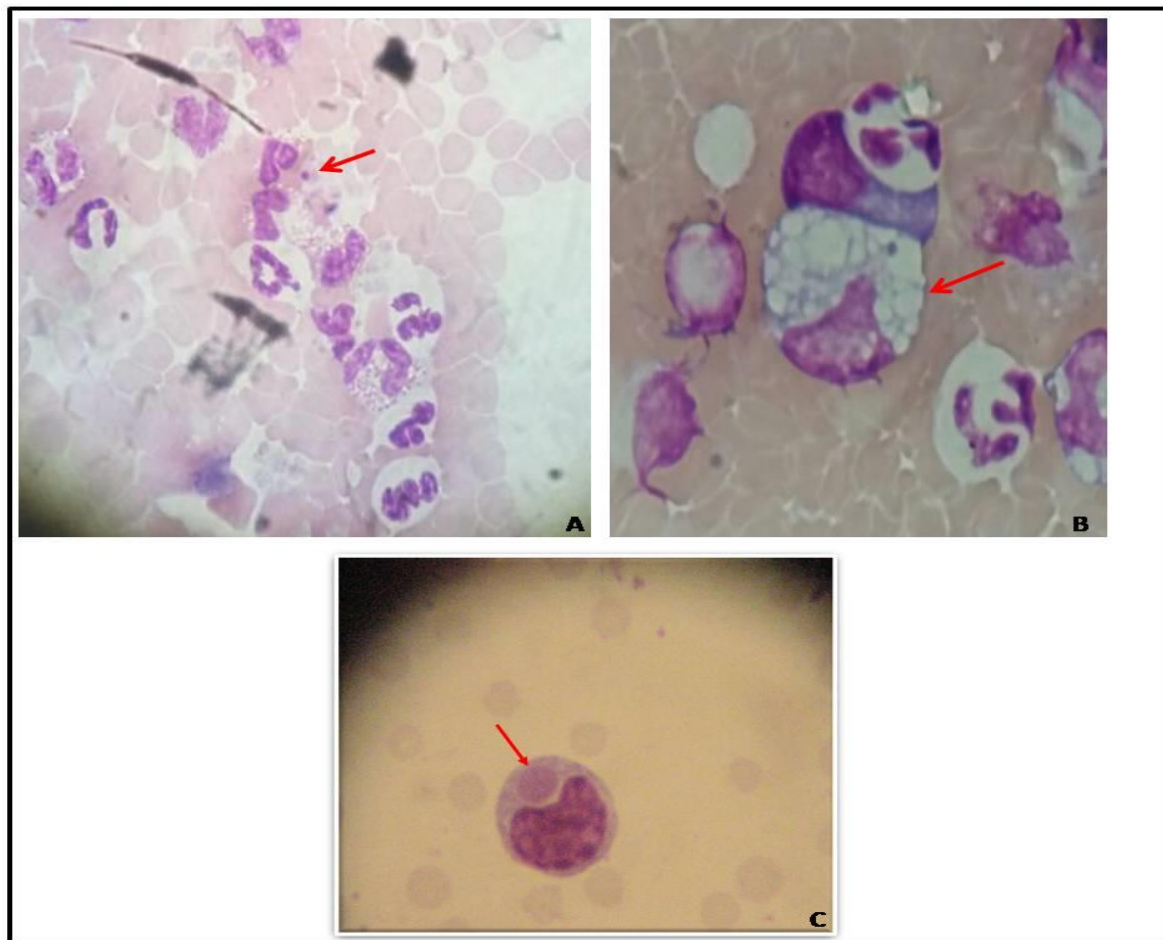


Figura 3. Células contendo inclusões intracitoplasmáticas sugestivas de parasitismo por hemoparasitos. A) Inclusões basofílicas encontradas em plaquetas, durante avaliação de esfregaço sanguíneo (setas). B) Monócito ativado sugestivo de parasitismo por *E. canis* C) Célula do sistema fagocítico mononuclear contendo inclusão sugestiva de parasitismo por *Ehrlichia canis*. Coloração Giemsa, microscopia óptica, aumento de 1000X.

Tabela 1. Análise da discordância entre o teste citológico e PCR, comparando os resultados obtidos quando amostras de cães foram submetidas ao diagnóstico de *Ehrlichia canis* neste estudo.

Diagnóstico Citológico	Diagnóstico Molecular		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	100	46*	146
Negativo	17*	104	121
Total	117	150	267
p*-valor	0,0004		

p<0,05 = discordância significativa entre os pares (McNemar).

Dentre os 117 animais nos quais foram detectados o DNA de *E. canis*, 60,68% (n=71/117) pertenciam a Mesorregião Metropolitana, 12,82% (n=15/117) a região Sul Fluminense, 14,52% (n=17/117) a Norte fluminense, 5,12% (n=6/117) a Centro Fluminense,

4,27% (n=5/117) a Noroeste Fluminense e 2,56% (n=3/117) provenientes da Baixada Litorânea (Tabela 2).

Tabela 2. Relação de positividade das amostras oriundas de cães coletadas de março de 2014 a abril de 2017 das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro

Mesorregião	Número de amostras	Positivos / N Mesorregião (%)	Positivos / N total (%)
Metropolitana	154	71/154 (46,1%)	71/267 (26,59%)
Sul Fluminense	30	15/30 (50%)	15/267 (5,61%)
Centro Fluminense	24	6/24 (25%)	6/267 (2,24%)
Norte Fluminense	33	17/33 (51,5%)	17/267 (6,36%)
Noroeste Fluminense	11	5/11 (45,45%)	5/267 (1,87%)
Baixada Litorânea	15	3/15 (20%)	3/267 (1,12%)
Total	267	117	117/267 (43,82%)

N: número de amostras coletadas de cães.

Dentre as 46 amostras que foram consideradas negativas para amplificação de um fragmento de 414 pb do gene *gp19* específico para *E. canis*, observou-se que em 10,8% (n=5/46) dessas amostras foi possível detectar um fragmento de 84 pb do gene *gltA* específico para *A. platys* (Tabela 3). Nestas amostras PCR-positivas para *A. platys*, apenas uma amostra (20%, n=1/5) foi positiva na análise citológica (Figura 3). Dentre as 46 amostras analisadas, não foi detectado o fragmento de 122 pb do gene *msp2* de *A. phagocytophilum*. O mesmo resultado foi observado na análise citológica em que não foi observada a presença do parasito. As cinco amostras consideradas positivas para *A. platys* pertenciam à mesorregião Metropolitana.

Tabela 3. Análise das amostras negativas para *Ehrlichia canis* obtidas de amostras de sangue de cães das mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

Amostra	<i>Anaplasma platys</i>			<i>Ehrlichia canis</i>		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
	qPCR	Cq	Cito	PCR	Cito	qPCR	Cito
18C	Positivo	28	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
29C	Positivo	25	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
30C	Positivo	26	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
31C	Positivo	26	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
37C	Positivo	32	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

qPCR = PCR em tempo real; Cq = Ciclos de quantificação; Cito = Citologia, PCR= PCR convencional

Na Tabela 4 está demonstrada a relação dos gêneros com a positividade, os machos (23,59%, n=63/138) apresentaram maior percentual quando comparados às fêmeas (19,85%,

n=53/129). No entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre eles ($p>0,05$).

Tabela 4. Frequência de positividade de amostras de sangue de cães para *Ehrlichia canis*, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em função do gênero, nas Mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

Gênero	N total	PCR - Positivos		χ^2	p (valor)*
		N	(%)		
Macho	138	63	45,65 ^a	0,56	0,45
Fêmea	129	53	41,08 ^a		
TOTAL	267	116	43,44%		

^a Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância. χ^2 : Valor do Qui-quadrado, p: p-valor.

Ainda sobre os aspectos inerentes aos animais, na Tabela 5 está demonstrada a relação da definição racial com a positividade. Os animais sem raça definida (SRD) (42,05%, n=90/214) apresentaram menor percentual quando comparados aos animais com raça definida (CRD) (49,05%, n=26/53). No entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre eles ($p>0,05$).

Tabela 5. Frequência de positividade de amostras de sangue de cães para *Ehrlichia canis*, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em função do tipo racial, nas Mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

Definição racial	N total	PCR - positivos		χ^2	p (valor)*
		n	(%)		
CRD	53	26	49,05 ^a	0,84	0,35
SRD	214	90	42,05 ^a		
TOTAL	267	116	43,44%		

^a Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância. χ^2 : Valor do Qui-quadrado, p: p-valor.

5 DISCUSSÃO

Ehrlichia canis está presente nas seis mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Até o presente momento, apenas na mesorregião Metropolitana havia sido realizada uma investigação epidemiomolecular para o agente da erliquiose canina (MACIEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2014). Dentro das mesorregiões, 60,68% (n=71/117) das amostras positivas pertenciam à mesorregião metropolitana, apresentando maior frequência de positividade em relação aos estudos realizados por Macieira et al. (2005) e Ferreira et al. (2014) que encontraram uma frequência de positividade de 16% e 5%, respectivamente, em cães na mesma área do estudo. Não há relatos de frequência de positividade pela técnica molecular nas mesorregiões Sul fluminense, Norte e Noroeste Fluminense, Centro Fluminense e Baixada Litorânea, contudo, sabe-se que há a circulação do agente pelas técnicas sorológicas e citológicas (OLIVEIRA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002, 2006; MIRANDA et al., 2006; COSTA et al., 2007; ALBERNAZ et al., 2007; ACETTA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2013; SALES et al., 2015).

O percentual total de animais positivos, utilizando-se a ferramenta molecular, foi similar aos encontrados por Nakaghi et al (2008) e Ueno et al. (2009), onde os pesquisadores encontraram frequências de positividade de 53,3% e 40% em amostras de cães atendidos no hospital Veterinário da UNESP/Jaboticaba/ São Paulo. No entanto, a frequência de positivos foi menor quando se comparou com as frequências das regiões Sul, Sudeste, Norte, Noroeste e Centro-Oeste do Brasil em que Aguiar et al. (2013) determinaram 65% de positividade entre as amostras de cães obtidas de hospitais veterinários e Centro de Controle de Zoonoses de todo Brasil. Baseados nestes estudos, se observa que amostras laboratoriais e de hospitais veterinários podem apresentar frequências de positividade superestimadas, uma vez que o tutor busca por serviços veterinários ao supor que seus animais não estejam completamente hígidos. No entanto, a importância desta doença no número de casos detectados na rotina clínica destaca a casuística crescente da doença em todo país (AGUIAR et al., 2013). A frequência de positividade do presente estudo em comparação aos estudos mundiais, também se apresentou maior, Eiras et al. (2013) e Mittal et al. (2017) descreveram um percentual de positividade de 5,8% a 9,3% na Argentina e Índia utilizando ferramenta molecular.

Estudos tem comprovado que a distribuição e disponibilidade do vetor *R. sanguineus* (s. l.) exerça papel importante na circulação da bactéria. Diferenças genéticas, nesta espécie de carrapato, indicam que há duas populações distintas de carrapato vermelho do cão na América Latina, sendo um de clima tropical e outro de clima temperado (MORAES-FILHO et al., 2013). O de clima tropical, predomina na América tropical e subtropical (Argentina, Colômbia, Paraguai, Peru e Brasil) já o de clima temperado predomina no Chile, Uruguai e um estado brasileiro (Rio Grande do Sul) (NAVA et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2013). O carrapato que corresponde a área tropical possui alta competência vetorial enquanto que o de clima temperado apresenta baixa competência de vetoração. Contudo, a falta de investigação molecular de *E. canis* em cães, nestas áreas que não possuem relato da bactéria, também podem contribuir para discrepância de resultados. Vale destacar que a prevalência de doenças regionais e a seleção da população também não podem ser descartadas quando interpretamos e comparamos dados em diferentes estudos (MACIEIRA et al., 2005).

Dentre as técnicas utilizadas no presente estudo, podemos perceber que há discordância entre os pares. A técnica citológica é frequentemente utilizada na rotina clínica, pois é uma técnica de baixo custo e que produz resultados satisfatórios principalmente na fase aguda da doença. No entanto, na fase crônica ou subclínica tende a ser menos sensível (HARRUS et al., 1998). Podemos perceber que amostras consideradas positivas na citologia, apresentaram-se negativas na PCR. Dentre estas amostras negativas para *E. canis* na citologia,

quase 11% apresentaram amplificação para um alvo de 84 pb do gene *gltA* específico para *A. platys*. A presença de inclusão sugestiva de parasitismo em monócitos pode muitas vezes confundir o diagnóstico do observador, já que outros organismos da família Anaplasmataceae também parasitam células do sistema fagocítico mononuclear (RIKIHISA et al., 2000). Outras espécies de *Ehrlichia* também podem parasitar monócitos, *Ehrlichia chaffeensis* se apresenta filogeneticamente próxima de *E. canis* e parasita células monocíticas de humanos. É conhecida por causar a Erliquiose Monocítica Humana (EMH), porém Dawson et al. (1996), Breitschwerdt et al. (1998) e Murphy et al. (1998) detectaram o DNA de *E. chaffeensis* em cães na Virgínia, Carolina do Norte e Oklahoma. No Brasil, *E. chaffeensis* foi encontrada apenas em cervos do Pantanal (SACCHI et al., 2009). Em cães já foi investigada a presença da bactéria, porém ainda não foi detectada (HARVEY et al., 2017). Cabe ressaltar que o diagnóstico incorreto pelo observador também pode ser considerado nestes casos (FERREIRA et al. 2007). Apesar da técnica citológica apresentar considerável sensibilidade no presente estudo, a técnica molecular apresentou-se mais específica, vide a distinção de positividade entre *E. canis* e *A. platys*, quando confrontada com a citologia. Para Mylonakis et al. (2003), estas alterações seriam devido a inobservância de mórulas, baseando-se muitas vezes na presença de monócitos ativadas. Outro fator a ser considerado é a forma com que se realiza o esfregaço sanguíneo, em sangue periférico, apesar de ser o método recomendado para hemoparasitoses, ocorre dificuldades na visualização de mórulas, pelo observador, devido ao longo tempo (12 a 17 dias) de transformação dos corpos elementares em mórulas. Nakaghi et al. (2008) demonstraram que dos 30 animais analisados, apenas um demonstrou positividade pela técnica de esfregaço sanguíneo. Cabe ressaltar ainda que, a presença de corpúsculos de inclusão em monócitos muitas vezes está relacionada à ativação do processo inflamatório podendo gerar confusão com mórulas de *E. canis*. A presença de grânulos densos, restos nucleares em megacariócitos e artefatos de técnica também podem confundir o observador (MYLONAKIS et al. 2003).

Em relação aos aspectos epidemiológicos, entre as características intrínsecas analisadas, gênero e raça foram fatores que não estiveram associados com a positividade de *E. canis* em cães do estado do Rio de Janeiro. Estes dados corroboram com os autores Baneth et al., (1996), Harrus et al., (1997), Sousa et al. (2010) e Guedes (2013) que em seus estudos não encontraram associação entre essas variáveis e a positividade para *E. canis* em cães. Os resultados demonstram também que a taxa de exposição foi maior em machos que em fêmeas, sendo os mesmos resultados observados por Maazi et al. (2014) que apesar de não observar diferença estatística significativa entre a exposição de *E. canis* entre machos e fêmeas, encontrou uma maior frequência de positividade em machos, fator diferentemente observado por Rodriguez-Vivas et al. (2005) que observaram exposição semelhante de machos e fêmeas à *E. canis*.

6 CONCLUSÕES

Ehrlichia canis está presente em todas as mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

O diagnóstico molecular com alvo em 414 pb do gene *gp19*, demonstrou ser uma ferramenta útil na detecção da bactéria, em comparação ao diagnóstico citológico.

O sexo e a raça dos cães não estão associados com o parasitismo por *E. canis* nos animais domiciliados nas mesorregiões estudadas do estado do Rio de Janeiro.

7- REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCETTA, E.M.T. *Ehrlichia canis* e *Anaplasmaplatysem* cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) trombocitopênicos da região dos lagos do Rio de Janeiro. 2008.61f. (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas) – Instituto de Veterinária, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Revista Ciência Rural**, v.37, n.3, 2007.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1026, p.103-5, 2004.

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

ALMEIDA, A.J.; PERNI, C.F.R.; MARIANO, F.A.; MELO, J.C.; MELO, V.C. **Ocorrência de Babesiasp e Ehrlichiasp associada a parâmetros eritrocitários em Campos - RJ**. In: XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, Rio de Janeiro. XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.

ALMEIDA, A.J.; CALDEIRA, M.S.; MARIANO, F.A.; SOUZA, I.J. **Ocorrência de Babesia sp. e Ehrlichia sp. em caninos domiciliados e no domiciliados no ano de 2005, em Campos dos Goytacazes, RJ**. Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses, p. 392, 2006.

ALMEIDA, A.J.; MARIANO, F.A.; STELZER, D.F.; SALES, I.S.; RODRIGUES, A.B.F.; FILIPPO, P.A. Hemoparasitosis control in dogs in Campos dos Goytacazes, Brazil. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.15, n.1, p.1-6, 2013.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935): **Avaliação parasitológica, hematológica, bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 115f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 1998.

ALMOSNY, N. R. D. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonose**. 1. ed. Rio de Janeiro: L. F., 2002.

AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Red and gray foxes--potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. **J. Wildl Dis.**, v.9, n.1, p.47-50, 1973.

ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z.; HIGA, A.C.; PEREIRA, G.T. **Deteção de anticorpos anti-Ehrlichia canis pelas técnicas de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Dot-ELISA correlacionando-as aos achados clínicos e hematológicos em cães naturalmente infectados**. In: Congresso de Iniciação Científica, 15, Marília. Anais...Marília: Universidade Estadual Paulista, 2003.

AZEVEDO, S.S.; AGUIAR, D.M.; AQUINO, S.F.; ORLANDELLI, R.C.; FERNANDES, A.R.F.; UCHOA, I.C.P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.48, n.1, p.14-18, 2011.

AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **Bioestat 5.0**. Sociedade Civil Mamirauá. Pará, 2007.

BAIN, B. Diagnosis from the Blood Smear. *New England Journal Medicine* p.498-507, 2005.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Vet. Rec.**, v.138, p.257-259, mar.16 1996.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.321-325, 2008.

BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **J. Vet. Intern. Med.**, v.10, n.4, p.271-4, 1996.

BOOL, P.H.; SUTMOLLER, P. *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, p.418-420, 1957.

BOTROS, B.A.; ELMOLLA, M.S.; SALIB, A.W.; CALAMAIO, C.A.; DASCH, G.A.; ARTHUR, R.R. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.62, n.1, p.41-3, 1995.

BREITSCHWERDT, E.B.; ABRAMS-OGG, A.C.; LAPPIN, M.R.; BIENZLE, D.; HANCOCK, S.I.; COWAN, S.M.; CLOOTEN, J.K.; HEGARTY, B.C.; HAWKINS, E.C. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. **J. Vet. Intern Med.**, v.16, n.6, p.642-9, 2002.

BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; HADDAD, S.; VIDOR, E.; RAOULT, D. Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Island. **Veterinary Microbiology**, v. 26, 103-105, 1991.

BULLA, C.; KIOMI TAKAHIRA, R.; PESSOA ARAÚJO, J.JR.; APARECIDA TRINCA, L.; SOUZA LOPES, R.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v.35, n.1, p.141-146, 2004.

CARLOS, R.S.; MUNIZ NETA, E.S.; SPAGNOL, F.H.; OLIVEIRA, L.L.; DE BRITO, R.L.; ALBUQUERQUE, G.R.; ALMOSNY, N.R. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus-Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.16, n.3, p.117-20, 2007.

CHARPENTIER, F.; GROULADE, P. Report of one case of probable feline ehrlichiosis. **Bull Acad. Vet. Fr.**, v.59, p.287-290, 1986.

CARVALHO, F.S.; WENCESLAU, A.A.; CARLOS, R.S.; ALBUQUERQUE, G.R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v.7, n.3, p.657-62, 2008.

CASTRO, M.B.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.T.; ALESSI, A.C.; COSTA, M.T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.1, p.73-86, 2004.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Disponível no site: <https://www.cdc.gov/ehrlichiosis/symptoms/index.html>. 2016. Acesso em: 23 de janeiro de 2018.

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

COSTA, J.O.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.P.; BATISTA JUNIOR, J.A. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brazil. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais**, v.25, p.199-200, 1973.

COSTA, L.M.Jr.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M.F.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Vet. J.**, v.174, n.3, p.673-6, 2007.

DAGNONE, A.S.; DE MORAIS, H.S.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, ou tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, n.4, p.283-290, 2003.

DAVOUST, B.; BOURRY, O.; GOMEZ, J.; LAFAY, L.; CASALI, F.; LEROY, E.; PARZY, D. Surveys on seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis among dogs living in the Ivory Coast and Gabon and evaluation of a quick commercial test kit dot-ELISA. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, p.464-469, 2006.

DAWSON, J.E.; CHILDS, J.E.; BIGGIE, K.L.; MOORE, C.; STALKNECHT, D.; SHADDOCK, J.; BOUSEMAN, J.; HOFMEISTER, E.; OLSON, J.G. White-tailed deer as a potential reservoir of *Ehrlichia* spp. **J. Wildl Dis.**, v.30, n.2, p.162-8, 1994.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.7, n.4, p.504-510, 2005.

EIRAS, D.F.; CRAVIOTTO, M.B.; VEZZANI, D.; EYAL, O.; BANETH, G. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.36, n.2, p.169-73, 2013.

EWING, S.A.; BUCKNER, R.G.; STRINGER, B.G. The coyote, a potential host for *Babesia canis* and *Ehrlichia* sp. **J. Parasitol.**, v.50, p.704, 1964.

FARIA, J.L.; DAGNONE, A.S.; MUNHOZ, T.D.; JOÃO, C.F. PEREIRA, W.A.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.19, n.2, p.98-102, apr-jun. 2010.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.**, v.5, p.113-119, 2007.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; CASTRO, T.X.; FERREIRA, E.O.; NEVES, F.P.G.; BARBOSA, A.V.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.P. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.301-308, 2014.

FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; JECKER, M.; SWIFT, P.K.; MADIGAN, J.E. Granulocytic ehrlichiosis and tick infestation in mountain lions in California. **J. Wildl Dis.**, v.35, n.4, p.703, 1999.

GARY, A.T.; WEBB, J.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. The low seroprevalence of tick-transmitted agents of disease in dogs from southern Ontario and Quebec. **Can. Vet. J.**, v.47, p.1194–1200, 2006.

HARRUS, S.; WANER, T.; WEISS, D.J.; KEYSARY, A.; BARK, H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.51, n.1-2, p.13-20, 1996.

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

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M.; SAMECK, J.H. Ehrlichiosis in wolves, dogs, and wolf-dog crosses. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.175, n.9, p.901-5, 1979.

INOKUMA, H.; OHNO, K.; YAMAMOTO, S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, n.10, p.1153-5, 1999.

INOKUMA, H.; MAKINO, T.; KABEYA, H.; NOGAMI, S.; FUJITA, H.; ASANO, M.; INOUE, S.; MARUYAMA, S. Serological survey of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infection of feral raccoons (*Procyon lotor*) in Kanagawa Prefecture, Japan. **Vet. Parasitol.**, v.145, n.1-2, p.186-9, 2007.

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

KAWAMURA, T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.79, n.4, 2002.

KELLY, P.J.; EOGHAIN, G.N.; RAOULT, D. Antibodies reactive with *Bartonellahenselae* and *Ehrlichia canis* in dogs from the communal lands of Zimbabwe. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.75, p.116–120, 2004.

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C.A. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.; AGUIAR, D.M.; YABSLEY, M.J.; DAVIDSON, W.R.; STROMDAHL, E.Y.; WILLIAMSON, P.C.; STICH, R.W.; LONG, S.W.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H.A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Vet Parasitol.**, v.143, n.2, p.189-95, 2007.

LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; JENSEN, W.A.; DUNNIGAN, B.; RHA, J.Y.; WILLIAMS, C.R.; BREWER, M.; FALL, M. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.225, n.6, p.893-6, 879, 2004.

LEWIS, G.E.JR.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M.; JOHNSON, A.J. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.36, n.1, p.85-8, 1975.

LIMA, R.S.S. **Ocorrência de *Dirofilaria immitis* anticorpos contra *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* e *E. canis* com ênfase ao estudo da Erliquiose canina no município de Valença, Rio de Janeiro.** 73f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)-Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2010.

LÓPEZ, J.; CASTILLO, A.; MUÑOZ, M.; HILDEBRANDT, S. Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminary *Ehrlichia canis* in Chile; preliminary report. **Arch. Med. Vet.**, v.31, n.2, 1999.

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

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Ehrliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.21, n.1, p.167-174, 2005.

MIRANDA, F.J.B.; ALBERNAZ, A.P.; MELO-JR, O.A.; MACHADO, J.A. **Diagnóstico da babesiose canina em sangue periférico em cães da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ.** Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses. P. 305, 2006.

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

MORAES, H. A.; ALMOSNY, N. R. P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados com *Ehrlichia* spp. **Clínica Veterinária**, v.9, n.48, p.28-30, 2004.

MOREIRA, S.M.; MACHADO, R.; PASSOS, L.F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciênc. Rur.**, v.35, p.958-960, 2005.

MOREIRA, N.S. ***Bartonella, Ehrlichia e Rickettsias* do grupo da febre maculosa em cães e em artrópodes: um estudo na região do médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro.** 82F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária- Área de concentração: Clínica e reprodução animal) PPMV/UFF, Niterói-RJ, 2011.

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

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

THEODOROU, K.; MYLONAKIS, M.E.; SIARKOU, V.I.; LEONTIDES, L.; KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K.; KRITSEPI-KONSTANTINOY, M.; BATZIAS, F.; FLOURAKI, E.; EYAL, O.; KONTOS, V.; HARRUS, S. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.68, n.7, p.1619-26, 2013.

NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. CANINE Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v.38, p.766-770, 2008.

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

OLIVEIRA, D.; TIE NISHIMORI, C.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. *Ehrlichia canis* antibodies detection by "Dot-ELISA" in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.9, n.1, p.1-5, oct.15 2000.

ORÍ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis*.** 2001. 89f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

ORTUÑO, A.; GAUSS, C.B.; GARCÍA, F.; GUTIERREZ, J.F. Serologicalevidence of *Ehrlichiaspp.* exposure in cats from northeasternSpain.**J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.**, v.52, n.5, p.246-8, 2005.

PARZY, D.; DAVOUST, B.; RAPHENON, G.; VIDOR, E.L. Ehrlichiose canine au Senegal: 56 enqueteseroepidemiologique humaine et canine a Dakar. **MedecineTropicale**, v.51, n.1, p.5963, 1991.

PELEG, O.; BANETH, G.; EYAL, O.; INBAR, J.; HARRUS, S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia* and *Babesia* in dogs. **Vet. Parasitol.**, v.173, n.3-4, p.292-9, 2010.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, p.110-7, 2006.

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

RIKIHISA, Y. Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses, and humans. **J. Vet. Intern.Med.**, v.14, p.250-251, 2000.

RISTIC, M.; HOLLAND, C.J.**Canine ehrlichiosis.**Z. WOLDEHIWET, Z.;Ristic, M.(Eds.), Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals, Pergamon Press, New York, p.169-186, 1993.

RODGERS, S.J.; MORTON, R.J.; BALDWIN, C.A.A serological survey of *Ehrlichia*, *Ehrlichiaequi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma.**J. Vet. Diagn.Invest.**, v.1, p.154-159, 1989.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ALBORNOZ, R.E.F.; BOLIO, G.M.E. *Ehrlichia* in dogs in Yucatan, Mexico: Seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Vet.Parasitol.**,v.127, p.75-79, 2005.

SÁINZ, A.; TESOURO, M.A.; RODRIGUEZ, F.; MAYORAL, L.; MAZZUCHELLI, F. Seroprevalence of *Ehrlichia* infections in police dogs in Spain.**Preventive VeterinaryMedicine**, v.23, p.179-182, 1995.

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

SAITO, T.B.; CUNHA-FILHO, N.A.; PACHECO, R.C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A.; LARSSON, C.E.; LABRUNA, M.B. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **Am. J. Trop. Med.Hyg.**,v.79, n.1, p.102-8, 2008.

SALES, M.R.R.P; IGNACCHITI, M.D.C.; JUNIOR, A.F.M.; SUHETT, W.G.; PORFÍRIO, L.C.; MOZART, M.; APTEKMANN, K.P; JÚNIOR, O.S.P. Prevalência de *Ehrlichia canis*

pela Nested-PCR, correlação com a presença de mórula e trombocitopenia em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.37, n.1, p.47-51, 2015.

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

SILVA, V.M. **Estudo de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodiidae) como potencial vetor de leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil, 2012.**

DA SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.; PECKLE, M.; DA COSTA, R.L.; VITARI, G.L.; SANTOS, L.A.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. A new quantitative PCR method for the detection of *Anaplasma platys* in dogs based on the citrate synthase gene. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.28, n.5, p.529-35, 2016.

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.15, n.1, p.13-6, 2006.

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

TARELLO, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *phagocytophilum* infection in Italian cats. **Vet. Rec.**, v.156, n.24, p.772-4, 2005.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S. VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; DE MORAIS, H.S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Vet. Parasitol.**, v.140, n.3-4, p.223-30, 2006.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; TREES, A.J. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. **Vet. Rec.**, v.152, p.97-105, 2003.

VIEIRA, R.F.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.; DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P. DE MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.20, n.1, p.1-12, 2011.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, T.S.; NASCIMENTO, D.A.; MARTINS, T.F.; KRAWCZAK, F.S.; LABRUNA, M.B.; CHANDRASHEKAR, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.55, n.5, p.335-40, 2013.

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

WELLMAN, M.L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R.M.; KOCIBA, G.J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, v.24, p.223–229, 1988.

YABSLEY, M.J.; NORTON, T.M.; POWELL, M.R.; DAVIDSON, W.R. Molecular and serologic evidence of tick-borne Ehrlichiae in three species of lemurs from St. Catherines Island, Georgia, USA. **J. Zoo Wildl Med.**, v.35, n.4, p.503-9, 2004.

YARCE, L.M.C.; OSORIO, L.A.R.; ARIAS, J.A.C. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros sospechados de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. **Rev. Med. Vet.**, n.29, p.51-62, 2015.

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

CONCLUSÕES GERAIS

Através de análise molecular, conclui-se que no estado do Rio de Janeiro, *Ehrlichia canis* está presente em todas as mesorregiões e que há diferenças genotípicas entre as amostras.

A diversidade de genes foi comprovada ao utilizar genes de superfície de membrana, ribossomais e de vias metabólicas.

Há importantes pontos de polimorfismo nas sequências oriundas das regiões Sul fluminense, Baixada litorânea e Metropolitana.

O gene *tuf* demonstrou ser um alvo útil para estudos que envolvam diferenciação intraespecífica, enquanto os genes *16S rDNA* e *gp 19* são bons alvos como ferramenta de diagnóstico por serem altamente conservados.

As variáveis sexo e raça dos cães não foram fatores associados ao parasitismo por *E. canis* nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

ANEXOS

Anexo I – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.

Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado aos responsáveis visitados nas Organizações não-governamentais (Ongs), dos municípios de Barra do Pirá (mesorregião Sul Fluminense) e município de Três Rios (mesorregião Centro Fluminense) localizados no estado do Rio de Janeiro.

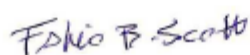
Anexo I. Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.



Seropédica 01 de agosto de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 072/2014 intitulado **“ANÁLISE GENOTÍPICA E PROTEÔMICA DE ISOLADOS DE Ehrlichia canis PRESENTES NAS MESORREGIÕES DO RIO DE JANEIRO.”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Carlos Luiz Massard. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 01 de agosto de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.



Fabio Barbour Scott



Jonimar Pereira Paiva

Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado aos responsáveis visitados nas Organizações não-governamentais (Ongs), dos municípios de Barra do Pirai (mesorregião Sul Fluminense) e município de Três Rios (mesorregião Centro Fluminense) localizados no estado do Rio de Janeiro.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL

Eu, _____ responsável pela
ONG: _____ telefone: _____, recebi explicações sobre o projeto **“ANÁLISE GENOTÍPICA E PROTEÔMICA DE SEQUÊNCIAS DE *Ehrlichia canis* PRESENTES NAS MESORREGIÕES DO RIO DE JANEIRO”** 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 e que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ___/___/___

Assinatura: _____