

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

DISSERTAÇÃO

**Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* em cães
naturalmente infectados da microrregião de Unaí, Minas
Gerais, Brasil**

Aroldo de Souza Junior

2026



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

Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados da microrregião de Unaí, Minas Gerais, Brasil

AROLDO DE SOUZA JUNIOR

Sob a orientação da Professora Doutora

Bruna de Azevedo Baêta

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2026

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

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

S719c Souza Junior, Aroldo, 2000-
Caracterização molecular de Ehrlichia canis em cães naturalmente infectados da microrregião de Unaí, Minas Gerais, Brasil / Aroldo Souza Junior. - Seropédica, RJ, 2026.
39 f.: il.

Orientadora: Bruna de Azevedo Baêta.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2026.

1. bactéria intracelular. 2. biologia molecular. 3. diversidade genética. 4. p28. 5. trp36. I. Baêta, Bruna de Azevedo, 1984-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III. Título.



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



ATA Nº 1143/2026 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.015678/2026-67

Seropédica-RJ, 06 de abril de 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AROLD DE SOUZA JUNIOR

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS DA MICRORREGIÃO DE UNAÍ, MINAS GERAIS, BRASIL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre(a) em Ciências Veterinárias.

Dissertação aprovada em 13 de março de 2026.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 07/04/2026 10:53)
BRUNA DE AZEVEDO BAETA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###475#9

(Assinado digitalmente em 12/05/2026 09:34)
RENATA FERNANDES FERREIRA DE MORAES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.847-##

(Assinado digitalmente em 08/04/2026 08:21)
JENEVALDO BARBOSA DA SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.506-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 1143, ano: 2026, tipo: ATA, data de emissão: 06/04/2026 e o código de verificação: a2b41070d4

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação representa a concretização de um percurso marcado por desafios, aprendizados e transformações pessoais e profissionais. Nenhuma etapa desse caminho teria sido possível sem o apoio de pessoas e instituições que estiveram ao meu lado, às quais registro aqui minha sincera gratidão.

À minha família, expresso minha gratidão pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo carinho nos momentos mais desafiadores. Vocês foram meu alicerce e minha maior fonte de motivação para seguir em frente.

Agradeço, em seguida, à minha orientadora, Profa. Bruna de Azevedo Baêta, pela confiança, pela orientação cuidadosa e pelo constante incentivo ao longo de todo o processo de pesquisa. Suas contribuições acadêmicas e humanas foram fundamentais para meu crescimento e para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do curso, que compartilharam conhecimentos essenciais para minha formação, agradeço pelas reflexões, ensinamentos e pelo compromisso com a ciência e a educação. Estendo esse agradecimento aos colegas de laboratório, com quem dividi inquietações, descobertas e momentos que tornaram essa caminhada mais leve e significativa.

Aos amigos, agradeço profundamente pelo apoio, pela compreensão nas minhas ausências e pelas palavras de incentivo nos momentos de dificuldade. A presença e o carinho de vocês foram fundamentais para que eu mantivesse a confiança e o equilíbrio ao longo desta jornada. Em especial, agradeço a um colega de trabalho que, ao longo do tempo, se tornou um grande amigo e incentivador, Jônathan Chagas. Muito obrigado!

Agradeço à Clínica PetStop pela gentil cessão do material utilizado neste estudo e também à equipe do Instituto de Ciências Agrárias da UFVJM (ICA/UFVJM) pela valiosa colaboração na colheita e no envio das amostras.

Agradeço também à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelo suporte que possibilitou a realização desta pesquisa.

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

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho. Esta conquista também é de vocês.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Aroldo de Souza Junior, filho de Aroldo de Souza e Eliane Souza de Andrade, nasceu em 19 de março de 2000, no município de Vassouras, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Municipal Joaquim Mendes, concluído em 2014 e o ensino médio no Colégio Estadual Ministro Raul Fernandes, concluído em 2017.

No segundo semestre de 2019 entrou na Universidade de Vassouras no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação realizou estágios em diversas áreas, sendo indicado como melhor estagiário no estágio de cirurgia de pequenos animais. Atuou como monitor voluntário nas disciplinas de fisiologia I, laboratório clínico I e II, nos anos de 2020 a 2023, concluindo o curso de Medicina Veterinária no segundo semestre de 2023.

Em março de 2024, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, no nível de Mestrado.

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

RESUMO

SOUZA JUNIOR, A. **Caracterização molecular de *Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados da microrregião de Unaí, Minas Gerais, Brasil.** 2026. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Ehrlichia canis é uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, responsável pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC), cuja transmissão ocorre por *Rhipicephalus linnaei* no Brasil. Sua distribuição é descrita em todas as regiões do país. Estudos envolvendo *E. canis* têm identificado proteínas imunorreativas que apresentam antígenos espécie-específicos e estão relacionadas à interação parasito-hospedeiro, fornecendo informações relevantes sobre a diversidade genética do patógeno. Nesse contexto, o presente estudo objetivou analisar a prevalência e a diversidade genética de *E. canis*, utilizando os genes *p28* e *trp36*, em amostras de sangue total de cães naturalmente infectados oriundos da microrregião de Unaí, Minas Gerais. Foram analisadas 386 amostras de sangue total de cães por meio de técnicas moleculares baseadas nos genes *p28* e *trp36*. Das amostras avaliadas, 3,1% (12/386) apresentaram amplificação para o gene *p28* de *E. canis*. Entre as amostras positivas para *p28*, 66,7% (8/12) amplificaram para o gene *trp36*. Para o sequenciamento e análise da diversidade genética, foram utilizadas 11 sequências do gene *p28* e cinco do gene *trp36*. As sequências obtidas para o gene *p28* apresentaram identidade variando de 99,27% a 100% quando comparadas a sequências de *E. canis* provenientes de diferentes regiões geográficas e, na análise da tradução de aminoácidos, foram observados sítios de mutação. A análise de rede de haplótipos baseada no gene *p28* revelou nove haplótipos distintos ($Hd = 0,9632$). Para o gene *trp36*, observou-se a circulação simultânea de genótipos americanos e brasileiros na região estudada, evidenciando ampla diversidade genética e heterogeneidade local. Conclui-se que as cepas de *E. canis* circulantes em cães na microrregião de Unaí, Minas Gerais, apresentam diversidade genética nos genes *trp36* e *p28*. A variação observada nas regiões de repetição em tandem e a presença de haplótipos exclusivos evidenciam fluxo gênico entre cepas. A co-circulação dos genogrupos BR e EUA reforça a complexidade genética do agente na região e destaca a importância do monitoramento molecular contínuo.

Palavras- chave: bactéria intracelular, biologia molecular, diversidade genética, *p28*, *trp36*

ABSTRACT

SOUZA JUNIOR, A. **Molecular characterization of *Ehrlichia canis* in naturally infected dogs from the microregion of Unaí, Minas Gerais, Brazil.** 2026. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Ehrlichia canis is a Gram-negative, obligate intracellular bacterium responsible for Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME), whose transmission occurs through *Rhipicephalus linnaei* in Brazil. Its distribution has been described in all regions of the country. Studies involving *E. canis* have identified immunoreactive proteins that present species-specific antigens and are related to host-parasite interaction, providing relevant information about the genetic diversity of the pathogen. In this context, the present study aimed to analyze the prevalence and genetic diversity of *E. canis*, using the *p28* and *trp36* genes, in whole blood samples from naturally infected dogs from the microregion of Unaí, Minas Gerais. A total of 386 whole blood samples from dogs were analyzed using molecular techniques based on the *p28* and *trp36* genes. Among the analyzed samples, 3.1% (12/386) showed amplification for the *p28* gene of *E. canis*. Among the samples positive for *p28*, 66.7% (8/12) amplified for the *trp36* gene. For sequencing and genetic diversity analysis, 11 sequences of the *p28* gene and five sequences of the *trp36* gene were used. The sequences obtained for the *p28* gene showed identity ranging from 99.27% to 100% when compared with *E. canis* sequences from different geographic regions and, in the amino acid translation analysis, mutation sites were observed. Haplotype network analysis based on the *p28* gene revealed nine distinct haplotypes ($H_d = 0.9632$). For the *trp36* gene, simultaneous circulation of American and Brazilian genotypes was observed in the studied region, demonstrating broad genetic diversity and local heterogeneity. It is concluded that *E. canis* strains circulating in dogs in the microregion of Unaí, Minas Gerais, present genetic diversity in the *trp36* and *p28* genes. The variation observed in tandem repeat regions and the presence of exclusive haplotypes demonstrate gene flow among strains. The co-circulation of BR and US genogroups reinforces the genetic complexity of the agent in the region and highlights the importance of continuous molecular monitoring.

Keywords: intracellular bacterium, molecular biology, genetic diversity, *p28*, *trp36*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *E. canis*. Fonte: Ferrolho *et al.*, 20254
- Figura 2.** Mapa de localização da Microrregião de Unaí, localizada na Mesorregião do Noroeste de Minas Gerais, Brasil. Fonte: https://pt.frwiki.wiki/wiki/Micror%C3%A9gion_d%27Una%C3%AD8
- Figura 3.** Representação dos produtos de PCR para o gene *trp36* de *E. canis* (800 a 1000pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 1,5%. Poços 1, 3, 6-10, 12: amostras testes positivas; poços 2, 4, 5, 11: amostras testes negativas; poço 14 e 15: controle negativo; poço 13: controle positivo, poço 16: ladder.12
- Figura 4.** Rede de haplótipos median-joining baseada nas sequências de *p28* de isolados de *E. canis* detectados em Unaí (MG), Brasil, e em países estrangeiros. Pequenas diferenças entre os haplótipos representam ocorrências mutacionais. Os círculos pretos representam as características intermediárias causadas por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).14
- Figura 5.** Árvore filogenética baseada em um fragmento do gene *p28* de cães da microrregião de Unaí, MG, Brasil, construída utilizando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura 3 parâmetros. Os valores de bootstrap são mostrados ao lado dos ramos. As diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios foram modeladas com uma distribuição Gama discreta (+G, parâmetro = 0,6816). A barra de escala indica o número de substituições por sítio. A análise incluiu 31 sequências e 792 posições de nucleotídeos alinhadas.....15
- Figura 6.** Árvore filogenética baseada em um fragmento do gene *trp36* de cães da microrregião de Unaí, MG, Brasil, construída utilizando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura 3 parâmetros. Os valores de bootstrap são mostrados ao lado dos ramos. As diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios foram modeladas com uma distribuição Gama discreta (+G, parâmetro = 1.0534). A barra de escala indica o número de substituições por sítio. A análise incluiu 30 sequências e 700 posições de nucleotídeos alinhadas.....17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conjuntos de oligoiniciadores específicos para o gene de <i>E. canis</i> utilizados para ensaios moleculares em sangue de cães.....	10
Tabela 2. Identidade entre as sequências de <i>p28</i> de <i>E. canis</i> do estudo e sequências depositadas no Genbank.....	13
Tabela 3. Substituições de aminoácidos no gene <i>p28</i> de <i>E. canis</i> em comparação com a sequência referência CP000107.....	13
Tabela 4. Substituições de aminoácidos no gene <i>p28</i> de <i>E. canis</i> em comparação com a sequência referência EF014897.....	14
Tabela 5. Identidade entre as sequências de <i>trp36</i> de <i>E. canis</i> do estudo e sequências depositadas no Genbank.....	15
Tabela 6. <i>Tandem repeat</i> e número de cópias entre as sequências de <i>trp36</i> de <i>E. canis</i> do presente estudo.....	16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Taxonomia e Agente etiológico.....	3
2.2 Transmissão e Ciclo biológico.....	3
2.3 Epidemiologia da erliquiose monocítica canina	4
2.4 Diagnóstico.....	5
2.4.1 Esfregaço sanguíneo	5
2.4.2 Sorologia	5
2.4.3 Detecção molecular.....	6
2.4.4 Isolamento e cultivo celular	6
2.5 Caracterização molecular e Diversidade genética de <i>Ehrlichia canis</i>	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Local do estudo.....	8
3.2 Seleção dos animais e obtenção das amostras	8
3.3 Extração de DNA e verificação de gene endógeno	9
3.4 Detecção molecular de <i>Ehrlichia canis</i> utilizando os genes <i>p28</i> e <i>trp36</i>	9
3.5 Eletroforese e análise dos resultados	10
3.6 Purificação e sequenciamento genético	10
3.7 Análise de haplótipos	10
3.8 Análise filogenética	11
4 RESULTADOS.....	12
5 DISCUSSÃO.....	18
6 CONCLUSÃO.....	20
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
ANEXOS.....	27

1. INTRODUÇÃO

No âmbito da medicina veterinária, as doenças transmitidas por carrapatos assumem papel de destaque devido ao impacto direto sobre a saúde e o bem-estar dos animais domésticos e de produção. Esses animais estão frequentemente expostos a carrapatos, que atuam como transmissores de diversos agentes patogênicos (Dantas-Torres; Chomel; Otranto, 2012). Nesse contexto, entre os microrganismos veiculados por carrapatos que acometem os animais domésticos, as bactérias do gênero *Ehrlichia*, em especial *Ehrlichia canis*, merecem destaque devido à elevada frequência de infecção em cães e à gravidade dos quadros clínicos associados (Sainz *et al.*, 2015).

Ehrlichia canis é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, pertencente ao gênero *Ehrlichia* e à família Anaplasmataceae. Parasita de células do sistema fagocitário mononuclear, esse gênero abrange cinco outras espécies, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium* e *Ehrlichia minasensis* (Vieira, 2011; Diniz; Aguiar, 2022).

Distribuída amplamente pelo mundo em regiões de clima tropical e subtropical, a transmissão de *E. canis* na América do Sul, ocorre principalmente através da picada do carrapato ixodídeo, *Rhipicephalus linnaei*, no momento do repasto sanguíneo (Chagas *et al.*, 2025).

Os sinais clínicos apresentados pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC) ou Pancitopenia Tropical Canina, varia de acordo com a fase de infecção (aguda, subclínica ou crônica). Na forma aguda, os sinais clínicos mais encontrados são letargia, anorexia, febre alta, linfadenomegalia, e possíveis hemorragias caracterizadas por petéquias, equimoses e epistaxe. A fase subclínica da doença cursa com sintomas brandos ou sem sintomatologia, sendo nesta fase a maior concentração de anticorpos contra o agente etiológico. Os animais que se encontram nessa fase podem eliminar a bactéria por completo se forem imunocompetentes ou progredirem para a fase crônica. Na fase crônica, sinais como anemia, fraqueza, sangramentos e perda de peso, são comumente encontrados (Harrus e Waner, 2011; Ueno *et al.*, 2009).

O diagnóstico pode ser realizado por diferentes abordagens laboratoriais, incluindo métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. A avaliação citológica, por meio da observação de esfregaços sanguíneos corados, permite a identificação de mórulas intracitoplasmáticas em leucócitos, embora apresente baixa sensibilidade, especialmente em fases crônicas da infecção. Entre os métodos sorológicos, destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o Western blotting, amplamente utilizados para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, sendo úteis para triagem e estudos epidemiológicos, porém com limitações quanto à distinção entre infecção ativa e exposição prévia. Por sua vez, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se consolidado como uma ferramenta de alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção direta do DNA do agente em amostras clínicas, como sangue total (Fonseca *et al.*, 2013).

Atualmente, quando se pensa em diversidade genética, genes como o 16S rRNA e o *dsb* se apresentam conservados. Com isso, estudos com proteínas imunorreativas vêm sendo realizados com o intuito de avaliar a diversidade genética. A proteína de superfície externa de 28 kDa (p28) é codificada por um locus multigênico, composto por pelo menos 22 alelos do gene p28 (p28-1 a p28-22) localizados nos cromossomos de *E. canis* e *E. chaffeensis* (Long *et al.*, 2002). Na América do Norte, o gene p28 mostrou-se conservado entre as sequências de *E. canis*, o que possibilitou sua utilização no desenvolvimento de antígenos com potencial vacinal (McBride *et al.*, 2000). Entretanto, diferenças genéticas têm sido observadas entre isolados brasileiros de *E. canis* e aqueles provenientes de outras regiões do mundo, evidenciando a existência de variabilidade genética associada a esse gene (Zhang *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2013; Chagas *et al.*, 2025). A glicoproteína de fase aguda TRP36 que também é exposta na superfície bacteriana e secretada no citoplasma do hospedeiro (Ferreira *et al.*, 2014), fornece

informações sobre a variabilidade genética de *E. canis*, possibilitando a identificação de genogrupos (Aguiar *et al.*, 2013; Cabezas-cruz *et al.*, 2014; Bouza-mora *et al.*, 2017).

O objetivo do presente estudo foi detectar e caracterizar molecularmente *E. canis* a partir de cães naturalmente infectados da microrregião de Unaí, Noroeste de Minas Gerais, utilizando os genes *p28* e *trp36*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e Agente etiológico

A classificação taxonômica de *E. canis* é a seguinte: pertence ao filo Pseudomonadota (Oren & Garrity, 2021), classe Alphaproteobacteria (Garrity *et al.*, 2005), ordem Rickettsiales (Gieszczykiewicz, 1939; Dumler *et al.*, 2001), família Anaplasmataceae (Philip, 1957; Dumler *et al.*, 2001), gênero *Ehrlichia* (Moshkovski, 1945) e espécie *E. canis* (Donatien & Lestoquard, 1935). Trata-se de uma bactéria pleomórfica e intracelular obrigatória, parasitando principalmente células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente monócitos, embora ocasionalmente possa infectar neutrófilos (Aguiar *et al.*, 2020). O microrganismo apresenta-se como pequenas unidades que se organizam em colônias compactas ou em inclusões denominadas mórulas, estruturas formadas pela agregação de corpúsculos elementares envolvidos por uma membrana (Elias, 1992; Harrus & Waner, 2011).

2.2 Transmissão e Ciclo biológico

A transmissão de *E. canis* pode ocorrer através da picada do vetor, por meio de transfusões sanguíneas, componentes sanguíneos ou agulhas contaminadas, especialmente em regiões onde a doença é endêmica (Aguiar *et al.*, 2020) e via transplacentária (Pereira *et al.*, 2025).

O ciclo biológico de *E. canis* inicia-se com a inoculação do agente durante a alimentação hematófaga de seu vetor, *R. linnaei* (complexo *Rhipicephalus sanguineus*). Após a picada, o processo inflamatório local desencadeia a liberação de mediadores químicos que promovem a quimiotaxia de células do sistema imune, favorecendo a invasão da bactéria nos leucócitos mononucleares, nos quais o agente se multiplica intracelularmente (Honorato, 2021). Durante seu ciclo intracelular, *E. canis* apresenta duas formas morfológicas distintas: o corpo elementar e o corpo inicial. O corpo elementar corresponde à forma infectante, metabolicamente menos ativa, sendo responsável pela adesão e entrada na célula hospedeira. Após a internalização por endocitose, o corpo elementar diferencia-se em corpo inicial, uma forma metabolicamente ativa que se multiplica por fissão binária no interior de vacúolos citoplasmáticos, formando estruturas conhecidas como mórulas. Posteriormente, parte dos corpos iniciais retornam a forma ativa, corpos elementares, sendo liberados para o meio extracelular, permitindo a infecção de novas células e a disseminação do agente no hospedeiro (Figura 1) (Ferrolho *et al.*, 2025).

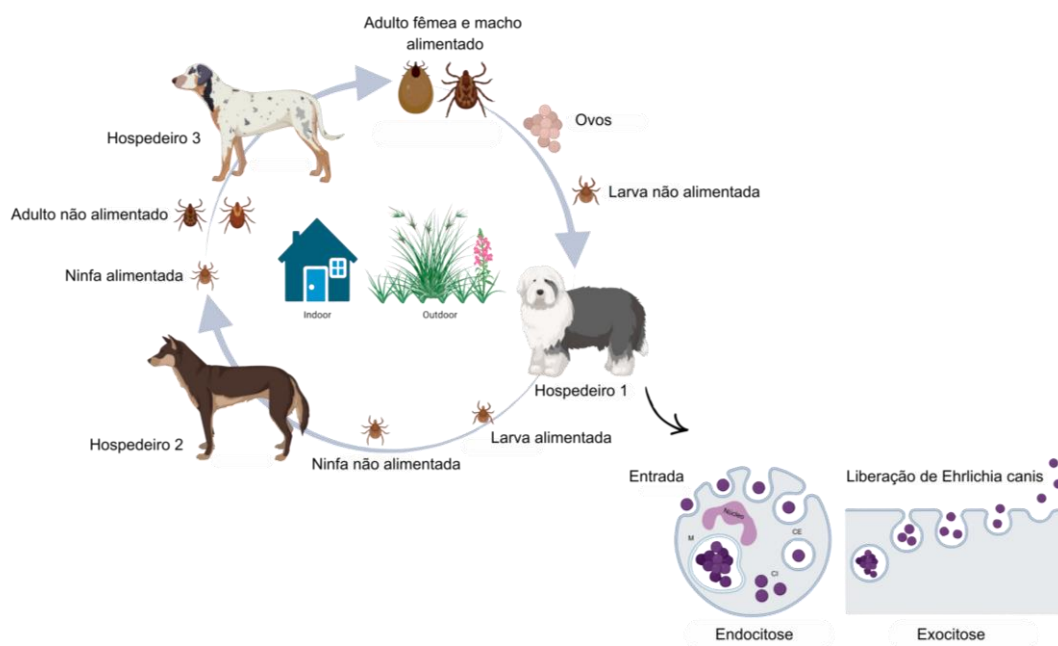


Figura 1. Ciclo biológico de *E. canis*. Fonte: Ferrolho *et al.*, 2025

2.3 Distribuição e Epidemiologia da Erliquiose Monocítica Canina no Brasil

Por se tratar de um agente transmitido por vetores, sua maior prevalência está diretamente associada às regiões com maior atividade do parasito, sendo mais comum em áreas tropicais e subtropicais (Rar; Golovljova, 2011). Nesse contexto, o vetor, o carrapato *R. linnaei*, apresenta elevada ocorrência em ambientes urbanos, o que se relaciona a uma característica específica de seu ciclo biológico: o tropismo por fendas e frestas de pisos, paredes e telhados. Embora menos frequente, populações desse carrapato também podem se estabelecer em áreas rurais, especialmente quando os animais permanecem confinados em espaços reduzidos, como abrigos ou pequenas estruturas de madeira (Dantas-Torres, 2010).

No Brasil, diversos estudos são realizados para determinar a prevalência da doença em diferentes regiões do país. Por exemplo, em Cuiabá, no Mato Grosso, um estudo foi realizado para detectar a soroprevalência de *E. canis*, onde demonstraram uma positividade de 42,5% (108/254) através da técnica de imunofluorescência direta (Silva *et al.*, 2010).

No estado do Espírito Santo, foi conduzido um estudo envolvendo 65 cães de diferentes raças, idades e sexos, domiciliados nos municípios de Vila Velha e Anchieta. Os animais foram avaliados por meio de testes sorológicos para detecção de imunoglobulina G (IgG), bem como por reação em cadeia da polimerase (PCR). Como resultados, apenas um animal apresentou positividade para *E. canis* pela PCR, enquanto aproximadamente 90% dos cães foram soropositivos, evidenciando uma expressiva discrepância entre os métodos diagnósticos e sugerindo elevada exposição prévia ao agente na população avaliada (Bittencourt *et al.*, 2022).

No estado do Paraná, foi avaliada uma população de 175 cães, cujas amostras foram selecionadas de forma aleatória, em média uma a cada cinco atendimentos clínicos, no período de 2013 a 2015. Nesse estudo, a investigação de hemoparasitos foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo, PCR e teste sorológico rápido para *E. canis*. Não foram identificados animais positivos para *E. canis* pela análise do esfregaço sanguíneo, tampouco por PCR; entretanto, quatro cães apresentaram resultado positivo apenas na sorologia (Bahense *et al.*, 2020). Na região Sudeste, no estado do Rio de Janeiro, um estudo avaliou a presença de *E.*

canis em 390 cães, dos quais 24,8% foram considerados positivos em qPCR (Paulino *et al.*, 2018). Em investigação subsequente, Costa *et al.* (2019) analisaram amostras de sangue de cães provenientes de seis mesorregiões do mesmo estado e relataram, por meio de PCR em tempo real, uma taxa de positividade de 42,3% (113/267) para *E. canis*.

No Norte do país um estudo retrospectivo foi realizado a fim de caracterizar as características epidemiológicas de *E. canis* no município de Manaus. Nesse estudo foi feito um levantamento de informações através das fichas de animais atendidos em clínicas e hospitais veterinários, e de um total de 1670 casos de doenças infecciosas, a erliquiose foi a doença mais frequente com 56,9% (950/ 1670) dos casos (Maciel; Da Silva; Santo, 2021).

2.4 Diagnóstico

A erliquiose canina é uma doença com sinais clínicos inespecíficos, o que dificulta o seu diagnóstico. Neste sentido, uma combinação de métodos diagnósticos pode ser usada para confirmar a positividade ou não para *E. canis*. Os métodos que podem ser utilizados para esse diagnóstico são: microscopia, sorologia, cultura celular e a biologia molecular, para detectar direta ou indiretamente *E. canis*, além das alterações laboratoriais que podem ocorrer durante a doença (Ferreira *et al.*, 2025).

2.4.1 Esfregaço sanguíneo

A citologia a partir de esfregaço sanguíneo é um exame considerado rápido e barato, sendo amplamente utilizado em áreas endêmicas durante a fase aguda da doença. O exame consiste na observação da estrutura conhecida como mórula dentro de células do sistema mononuclear fagocitário, sendo esses presencionalmente os monócitos, porém podem ser encontradas em linfócitos e neutrófilos (Aguiar *et al.*, 2020). Esse exame apesar de rápido e barato possui como desvantagem, a baixa sensibilidade, o que o torna muitas vezes ineficaz no diagnóstico, sendo frequente falsos negativos, em especial dependendo da fase em que a doença se encontra (Santarém, 2003).

O esfregaço da capa leucocitária apresenta maior sensibilidade para a detecção de mórulas de *E. canis* quando comparado ao esfregaço sanguíneo convencional. Mylonakis *et al.* (2003), ao avaliarem a sensibilidade de cinco técnicas citológicas em 50 cães naturalmente infectados e na fase aguda da erliquiose, observaram que a análise do esfregaço da capa leucocitária, sob objetiva de imersão (100×) e após a avaliação de 1.000 campos microscópicos, alcançou sensibilidade de 66%.

Ressalta-se, entretanto, que estruturas como plaquetas, grânulos azurófilos de linfócitos e material nuclear fagocitado podem ser erroneamente interpretadas como inclusões erliquiais (Harrus; Waner, 2011).

2.4.2 Sorologia

A sorologia é principalmente empregada nos casos em que o diagnóstico citológico foi negativo, ou seja, o animal apresenta sintomatologia característica, porém não foi observada a presença de mórulas de *E. canis*. Existem algumas técnicas que podem ser utilizadas como, ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta). Essas técnicas consistem em buscar o antígeno ou o anticorpo para aquele agente. É uma técnica muito sensível e possui uma alta especificidade, porém algumas desvantagens também são observadas, como a demora na soroconversão e a possível reação cruzada com outros agentes da mesma família, além de não diferenciarem infecção ativa de exposição prévia (Harrus *et al.*, 2002).

Testes sorológicos baseados em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA foram desenvolvidos para o diagnóstico da infecção por *E. canis*. Durante o curso da infecção, as proteínas ricas em repetições em tandem TRP19 e TRP36 desempenham papel central como

principais antígenos imunorreativos e alvos primários da resposta humoral do hospedeiro. Com o objetivo de avaliar a sensibilidade e a especificidade dessas proteínas no imunodiagnóstico espécie-específico, diversos estudos utilizaram proteínas recombinantes e ensaios baseados em peptídeos sintéticos (Doyle *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007; McBride *et al.*, 2007).

Nesses estudos, foram identificados os principais epítomos reconhecidos por anticorpos nas regiões de repetições em tandem das proteínas TRP de *E. canis* e *E. chaffeensis*. Tais epítomos apresentam diferenças moleculares que permitem a detecção de anticorpos específicos para cada espécie, constituindo um aspecto fundamental para a correta identificação do agente infeccioso. Nesse contexto, ensaios ELISA baseados em peptídeos derivados das proteínas TRP19 e TRP36 vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de detectar infecções causadas por diferentes genótipos de *E. canis* (Aguiar *et al.*, 2016; Taques *et al.*, 2020; Medeiros *et al.*, 2020).

Atualmente, kits comerciais do tipo Dot-ELISA para a detecção de anticorpos IgG contra *E. canis* estão amplamente disponíveis e são comumente empregados na rotina clínica veterinária. Entre eles, destacam-se o teste ImmunoComb® Dot-ELISA (Biogal, Galed Laboratories) e o ensaio SNAP® 4Dx® Plus, que utiliza peptídeos sintéticos derivados das principais proteínas imunodominantes de *E. canis*, como P30 e P30-1 (IDEXX Laboratories) (Medeiros *et al.*, 2020).

2.4.3 Detecção molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste em uma técnica de amplificação enzimática de regiões específicas do DNA-alvo, caracterizando-se como um método rápido, sensível e altamente específico para a detecção de microrganismos (Rodriguez, 1997). No diagnóstico da infecção por *E. canis*, a PCR destaca-se como uma ferramenta eficaz por permitir a detecção direta do DNA do agente, possibilitando a identificação de infecções ativas mesmo em fases com baixa carga bacteriana, incluindo a fase crônica. Dessa forma, apresenta vantagem em relação aos métodos sorológicos, os quais detectam apenas anticorpos produzidos pelo hospedeiro em resposta à infecção, não permitindo distinguir entre exposição prévia e infecção ativa. Assim, a PCR supera limitações relacionadas à sensibilidade e à especificidade observadas em testes sorológicos, sendo amplamente utilizada como método complementar ou confirmatório no diagnóstico da erliquiose monocítica canina (McBride *et al.*, 1996).

Apesar de sua elevada sensibilidade, capaz de detectar a presença da bactéria no hospedeiro mesmo antes do aparecimento de sinais clínicos, resultados falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer, especialmente em função de fatores técnicos e biológicos, como carga bacteriana reduzida e qualidade da amostra (Harrus; Waner, 2011). Diferentes abordagens da PCR podem ser empregadas, incluindo a PCR convencional e a PCR em tempo real (qPCR), esta última permitindo, além da detecção qualitativa, a quantificação da carga bacteriana na amostra analisada.

Diversos genes-alvo podem ser utilizados para o diagnóstico molecular de *E. canis*, dentre os quais se destacam o 16S rRNA, *p28* e *p30*, cada um apresentando particularidades quanto à sensibilidade e especificidade. Embora a PCR seja considerada um dos métodos diagnósticos mais seguros e assertivos para a detecção da infecção, poucas técnicas encontram-se devidamente validadas para uso diagnóstico rotineiro, em razão da complexidade metodológica, da dificuldade de padronização e do custo mais elevado quando comparadas a outros testes disponíveis (Ramos *et al.*, 2009).

2.4.4 Isolamento e cultivo celular

O diagnóstico através do isolamento de *E. canis* pode ser realizado por meio do cultivo do agente em células da linhagem DH82, estabelecida a partir de células derivadas de um histiocitoma canino. O método é sensível e definitivo para o diagnóstico de *E. canis*, porém é uma técnica demorada, trabalhosa e depende de uma estrutura elaborada. Além disso, o

crescimento pode demorar até 10 semanas após a inoculação do agente. Posto isso, o isolamento é mais utilizado em laboratórios de pesquisa do que como ferramenta de diagnóstico na rotina laboratorial (Harrus; Waner, 2011).

2.6 Caracterização molecular e Diversidade genética

Ehrlichia canis é uma bactéria que se reproduz por fissão binária e, diferentemente de organismos que realizam recombinação sexual, não promove troca direta de material genético. Dessa forma, a diversificação genética dessa espécie ocorre principalmente por meio de processos mutacionais ao longo do tempo. Assim, para a identificação de variações genéticas intraespecíficas, torna-se necessária a utilização de alvos moleculares específicos, como os Simple Sequence Repeats (SSR). Esses marcadores são amplamente empregados em estudos genéticos devido à sua natureza multialélica, facilidade de detecção por PCR, abundância relativa, ampla distribuição ao longo do genoma e à necessidade de pequenas quantidades de DNA para a amplificação (Costa, 2018).

Nesse contexto, proteínas de superfície têm sido cada vez mais exploradas em estudos de diversidade genética, especialmente aquelas diretamente envolvidas na interação parasito–hospedeiro. Dentre elas, destacam-se as proteínas p28 e TRP36, que são altamente imunorreativas e desempenham papel relevante na resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *E. canis*.

Devido à sua elevada antigenicidade e à grande similaridade observada entre sequências norte-americanas, a proteína p28 de *E. canis* tem sido apontada como uma candidata promissora para o desenvolvimento de vacinas (McBride *et al.*, 2000). Adicionalmente, um ensaio de PCR baseado no gene *p28* foi desenvolvido para a detecção molecular de *E. canis* (Nakaghi *et al.*, 2010).

As proteínas TRP36 e TRP19 também possuem seus genes amplamente estudados e são frequentemente utilizados para a identificação de diferentes variantes genéticas dentro da espécie *E. canis*. Ambas são glicoproteínas recombinantes, espécie-específicas e imunorreativas (Cárdenas *et al.*, 2007). O gene que codifica a proteína TRP19 apresenta elevado grau de conservação, o que favorece sua aplicação no desenvolvimento de vacinas e em testes sorológicos com maior sensibilidade (Taques *et al.*, 2016). A TRP19 é composta por 137 aminoácidos e está associada à membrana da mórula formada no citoplasma da célula hospedeira (McBride *et al.*, 2007).

Durante a fase aguda da infecção, a glicoproteína TRP36 é expressa na membrana bacteriana e secretada para o citoplasma da célula do hospedeiro (Taques *et al.*, 2016). O gene da TRP36 codifica três regiões distintas: uma região 5'-terminal com aproximadamente 429 pb; uma região central formada por repetições em tandem não variáveis, e uma região 3'-terminal com cerca de 80 a 93 pb (Doyle *et al.*, 2006). O número de repetições em tandem varia conforme o isolado (McBride *et al.*, 2003).

Através do gene *trp36* foi possível identificar 4 genogrupos de *E. canis* distribuídos pelo mundo (Navarrete *et al.*, 2022), genogrupo americano (USA) (Ferreira *et al.*, 2014; Zweygarth *et al.*, 2014; Chagas *et al.*, 2025) identificado na América do Norte, Brasil, Nigéria, Camarões, Espanha, Turquia e Israel; Taiwan (TWN) (Hsieh *et al.*, 2010), identificado na África do Sul, Tailândia, Turquia e Taiwan; Brasil (BR) (Aguilar *et al.*, 2013; Aktas; Özubek, 2019; Chagas *et al.*, 2025), identificado nas regiões centro-oeste, norte e sul do Brasil e recentemente na Turquia; e o Costa Rica (CR) (Bouza-mora *et al.*, 2017), detectado em doadores de sangue humanos da Costa Rica e descrito em caninos de quatro assentamentos peruanos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O presente estudo foi realizado a partir de animais oriundos da microrregião de Unaí, localizada na Mesorregião do Noroeste de Minas Gerais (MG). A microrregião possui uma extensão territorial de 27.384km² com clima predominantemente tropical, abrangendo os municípios de Arinos, Bonfinópolis de Minas, Buritis, Cabeceira Grande, Dom Bosco, Formoso, Natalândia, Unaí e Uruana de Minas (Figura 2).

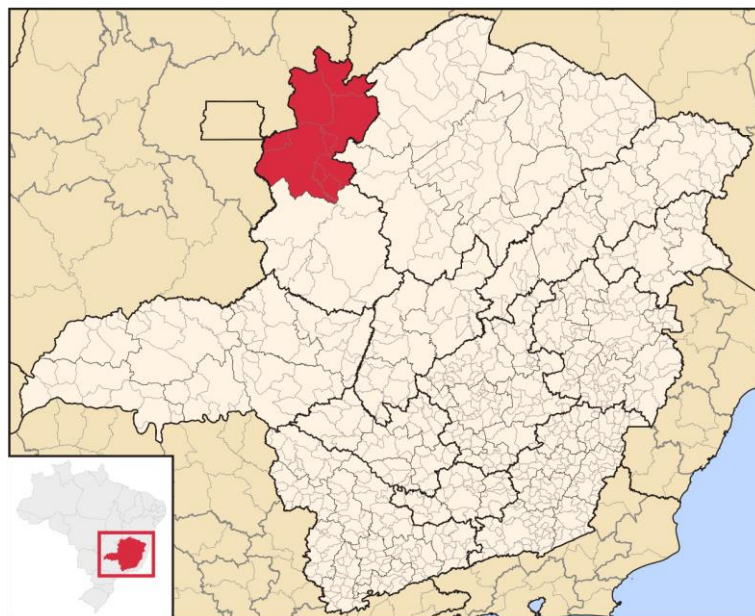


Figura 2. Mapa de localização da Microrregião de Unaí, localizada na Mesorregião do Noroeste de Minas Gerais, Brasil.

Fonte: https://pt.frwiki.wiki/wiki/Micror%C3%A9gion_d%27Una%C3%AD

3.2 Seleção dos animais e obtenção das amostras

O tamanho mínimo da amostra necessário para as análises moleculares foi calculado usando a fórmula descrita por Agranonik e Hirakata (2011), que considera o nível de confiança, a proporção estimada e a margem de erro aceitável. A fórmula é expressa da seguinte forma: $n = (Z^2 \times P \times (1 - P)) / e^2$, onde n é o tamanho da amostra, Z é o valor crítico da distribuição normal para um nível de confiança de 95% (1,96), P é a proporção populacional estimada (neste caso, definida em 50%) e e é a margem de erro (5%). Substituindo esses valores na equação, resultou em um tamanho mínimo de amostra de 384 indivíduos.

Para a obtenção das amostras sanguíneas, realizou-se a coleta de 3 mL de sangue por venopunção cefálica. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e posteriormente armazenadas sob refrigeração. Inicialmente, as amostras foram processadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto de Ciências Agrárias da UFVJM (ICA/UFVJM), onde foram realizadas as etapas preliminares de manipulação e triagem. Em seguida, o material foi encaminhado ao Laboratório de Estudo da Interação Parasito-Hospedeiro (LEIPH), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), para realização das análises laboratoriais. Foram amostrados 386 cães de ambos os sexos, sem restrição quanto à raça ou idade, provenientes da microrregião de Unaí, Minas Gerais.

O presente estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, sob nº. 015/2021.

3.3 Extração de DNA e verificação de gene endógeno

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizada a partir de 300 µL de sangue total, utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram acondicionadas em microtubos de polipropileno devidamente identificados e armazenadas a -20 °C até a realização das análises moleculares.

A presença de DNA amplificável foi confirmada por meio de reação de PCR convencional direcionada a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), com amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pares de base (pb). Para essa reação, foram utilizados os oligoiniciadores GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'), conforme descrito por Birkenheuer, Levy e Breitschwerdt (2003).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 2 µL de DNA molde. A mistura reacional apresentou as seguintes concentrações finais: 1 U de Taq DNA polimerase (GoTaq®, Promega®), 0,8 µM de cada oligoiniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e tampão de reação 1X (Colorless GoTaq®, Promega®). O volume final foi completado com água ultrapura livre de DNases. Como controle negativo, utilizou-se água ultrapura livre de DNases em substituição ao DNA molde.

A amplificação foi conduzida em termociclador T100™ (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®), sob as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos e 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 25 segundos, com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Após a confirmação da amplificação do gene *gapdh*, as amostras foram submetidas às reações de PCR específicas para os alvos de interesse.

3.4 Detecção molecular de *Ehrlichia canis* utilizando os genes *p28* e *trp36*

Para a detecção e caracterização molecular, as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento do gene *p28*, visando à obtenção de um produto de aproximadamente 843 pares de base (pb) (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 2 µL de DNA extraído, tampão de reação 1X (Colorless GoTaq®, Promega®), 2,5 mM de MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada oligoiniciador e 1 U de Taq DNA polimerase (GoTaq®, Promega®). O volume final foi completado com água ultrapura livre de DNases.

A amplificação foi conduzida em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos e 30 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos, com etapa final de extensão a 72 °C por 5 minutos.

Para a amplificação de um fragmento do gene *trp36*, as amostras previamente positivas para *E. canis* por PCR direcionada ao gene *p28* foram submetidas a uma PCR semi-nested (Tabela 1). Na primeira reação, utilizou-se um volume final de 25 µL, contendo 3 µL de DNA extraído, tampão de reação 1X (Colorless GoTaq®, Promega®), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,8 µM de cada oligoiniciador e 1 U de Taq DNA polimerase (GoTaq®, Promega®), sendo o volume final completado com água ultrapura livre de DNases. Na segunda reação, as condições e concentrações dos reagentes foram mantidas, com exceção do DNA molde, para o qual foram utilizados 2 µL do produto amplificado na primeira reação.

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

Genes	Ensaio	Iniciadores de oligonucleotídeos	Tamanho produto	Referências
<i>p28</i>	PCR	F 5-ATGAATTGCAAAAAAATTCTTATA-3 R 5-TTAGAAGTTAAATCTTCTCC-3	843pb	Nakaghi <i>et al.</i> , 2010
<i>trp36</i>	PCR	F 5-TTTAAAACAAAATTAACACACTA-3 R 5-AAGATTAACCTTAATACTCAATATTACT-3	800 a 1000pb	Aguiar <i>et al.</i> , 2014
	snPCR	R 5-CACACTAAAATGTATAATAAAGC-3		

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

As condições de termociclagem para ambas as etapas da PCR semi-nested consistiram em desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Como controle positivo, foi utilizado DNA de *E. canis* obtidos a partir de sangue canino naturalmente infectado, confirmado por sequenciamento genético. Água ultrapura livre de DNases foi utilizada como controle negativo em todas as reações.

3.5 Eletroforese e análise dos resultados

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) sob uma corrente de 75 V (5V/cm) por 90 minutos em TAE (Tris, acetato e EDTA). Em seguida, foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados através de um transiluminador com luz ultravioleta (L-PIX Sti, Locus). A fim de determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado um padrão de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega®).

3.6 Purificação e sequenciamento genético

Os produtos de PCR provenientes de amostras positivas para os genes *p28* e *trp36* foram purificados a partir de alíquotas de 5 µL, utilizando o reagente ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific®), conforme as recomendações do fabricante. Para os amplificados do gene *p28*, foi realizada uma reação de sequenciamento padrão, composta por uma etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, seguida de 33 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos, anelamento do primer a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 3 minutos. Para os produtos amplificados do gene *trp36*, houve a adaptação das condições de anelamento para 47 °C por 8 segundos, conforme descrito por Chagas *et al.* (2025).

Todas as reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Applied Biosystems® 9700, e os produtos foram analisados em analisador genético Applied Biosystems®, modelo 3500.

3.7 Análise de haplótipos

A análise de haplótipos foi realizada com o objetivo de inferir a estrutura populacional e a dinâmica evolutiva de cepas de *E. canis* circulantes em cães no estado de Minas Gerais. Inicialmente, os principais índices de polimorfismo foram calculados no programa DnaSP v6.12.03, incluindo o número de sítios polimórficos (S), o número total de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd) e a diversidade nucleotídica (π) (Rozas *et al.*, 2017). As

estimativas foram obtidas após a remoção de lacunas e a exclusão de sítios invariáveis, garantindo que apenas posições informativas contribuíssem para a inferência da variabilidade genética da espécie.

Em seguida, para a visualização da distribuição e frequência dos haplótipos, foi construída uma rede de haplótipos utilizando o método de median-joining no programa PopART v1.7. O conjunto de dados incluiu 11 sequências do gene *p28* obtidas neste estudo e 19 sequências de referência provenientes de diferentes localidades, incluindo Brasil, Estados Unidos, Índia, Filipinas e Vietnã.

3.8 Análise filogenética

Os cromatogramas foram analisados e as sequências de nucleotídeos foram montadas e editadas usando o software CLC Main Workbench 23 (CLC Bio-Qiagen). As sequências foram então submetidas à análise de similaridade por meio do programa BLASTn, utilizando o banco de dados de nucleotídeos do NCBI GenBank. Sequências homólogas previamente publicadas em outros estudos foram recuperadas em formato FASTA e alinhadas com as sequências obtidas neste estudo usando o algoritmo de alinhamento múltiplo ClustalW implementado no software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). O banco de dados alinhado foi posteriormente aparado.

A análise filogenética de *E. canis* foi realizada com base em conjuntos de dados que compreendem 792 pb do gene *p28* com 30 sequências de *E. canis* e 700 pb do gene *trp36* com 30 sequências. As sequências do grupo externo utilizadas foram *Ehrlichia chaffeensis* strain Arkansas (CP000236) para o *p28* e *E. chaffeensis* (DQ085431) para o gene *trp36*.

As árvores filogenéticas foram inferidas usando o método de Máxima Verossimilhança (MV), aplicando o modelo de substituição de Tamura 3 parâmetros com distribuição Gamma (T92+G) para o gene *p28* e o gene *trp36*. As análises foram realizadas no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), com seleção do modelo evolutivo baseada no Critério de Informação de Akaike (AIC). O suporte estatístico para os clados foi estimado por análise de bootstrap com 1000 réplicas usando busca heurística. A formatação final da árvore filogenética foi feita usando o Inkscape v1.3.2.

4. RESULTADOS

Todas as amostras analisadas no presente estudo apresentaram amplificação para um fragmento de aproximadamente 400 pb correspondente ao gene endógeno *gapdh*, confirmando a qualidade e a integridade do DNA extraído. A partir dessa confirmação, as amostras foram submetidas à detecção molecular de *E. canis* por meio da amplificação do gene *p28*, na qual 3,1% (12/386) das amostras apresentaram amplificação de um fragmento de 843 pb. Todas as amostras positivas no gene *p28* foram encaminhadas para o sequenciamento genético, entretanto, uma amostra apresentou cromatograma de baixa qualidade, sendo utilizadas 11 amostras para as análises filogenéticas.

Quando submetidas à amplificação do gene *trp36* de *E. canis*, oito das 12 amostras previamente positivas para o agente apresentaram amplificação (Figura 3). Após o sequenciamento, cinco amostras foram incluídas na análise da diversidade genética, uma vez que as demais apresentaram cromatogramas com baixa qualidade.

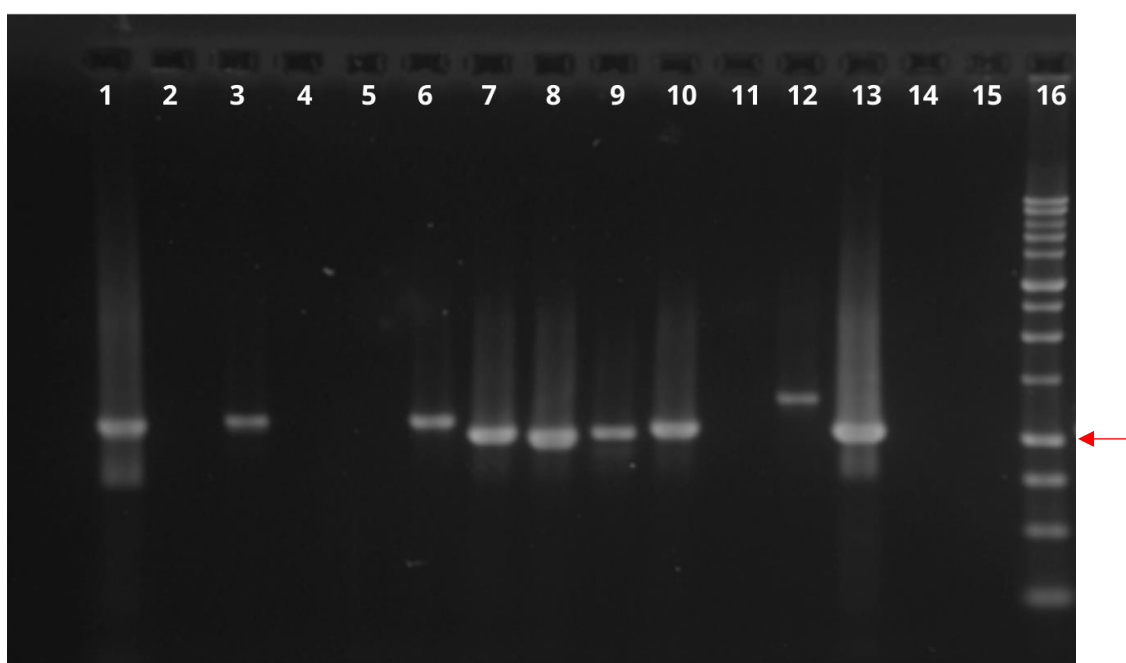


Figura 3. Representação dos produtos de PCR para o gene *trp36* de *E. canis* (800 a 1000pb) (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 1,5%. Poços 1, 3, 6-10, 12: amostras testes positivas; poços 2, 4, 5, 11: amostras testes negativas; poço 14 e 15: controle negativo; poço 13: controle positivo, poço 16: ladder.

Na análise de identidade das sequências nucleotídicas obtidas a partir do gene *p28*, as sequências geradas no presente estudo apresentaram identidade variando de 99,27% a 100% quando comparadas a sequências de *E. canis* provenientes de diferentes regiões geográficas (Tabela 2).

Tabela 2. Identidade entre as sequências de *p28* de *E. canis* do estudo e sequências depositadas no Genbank.

Amostras	Localidade	Nº. acesso Genbank	Homologia (%)	Query coverage (%)
Amostra 8	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,40	100
Amostra 9	<i>E. canis</i> cepa Jaboticabal (BR)	EF014897	99,88	100
Amostra 20	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,27	100
Amostra 21	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,51	100
Amostra 24	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,63	100
Amostra 26	<i>E. canis</i> cepa Jaboticabal (BR)	EF014897	99,76	100
Amostra 38	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,63	100
Amostra 40	<i>E. canis</i> cepa Jaboticabal (BR)	EF014897	99,52	100
Amostra 45	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,39	100
Amostra 49	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,88	100
Amostra 404	<i>E. canis</i> cepa Jake (EUA)	CP000107	99,88	100

Para a análise das sequências do gene *p28*, os nucleotídeos foram traduzidos em aminoácidos com o objetivo de identificar os sítios de mutação. As sequências que apresentaram maior identidade com *E. canis* cepa Jake (CP000107), a mesma foi utilizada como referência, enquanto aquelas que demonstraram maior identidade com *E. canis* cepa Jaboticabal (EF014897) tiveram esta última adotada como sequência de referência para as comparações.

A comparação das sequências de aminoácidos do gene *p28* com a cepa de referência *E. canis* cepa Jake (CP000107) demonstrou 11 sítios de mutação, localizados nas posições 64, 68, 79, 80, 82, 142, 144, 150, 152, 203 e 253 (Tabela 3). As substituições de aminoácidos ocorreram de forma variável entre as amostras analisadas, evidenciando polimorfismo intraespecífico.

Tabela 3. Substituições de aminoácidos no gene *p28* de *E. canis* em comparação com a sequência referência CP000107.

Sequências	Posição do aminoácido										
	64	68	79	80	82	142	144	150	152	203	253
<i>E. canis</i> cepa Jake (CP000107)	K	N	N	I	T	H	S	S	S	N	E
Amostra 8	.	.	S	.	K	.	.	.	D	.	K
Amostra 20	A	.	S	.	K	.	.	.	D	.	.
Amostra 21	R	D	.	T	.	.	P	.	.	.	.
Amostra 24	R	D	.	T	.	.	.	.	.	.	.
Amostra 38	R	D	.	T	.	.	.	.	.	.	.
Amostra 45	R	D	.	T	.	.	P	P	.	.	.
Amostra 49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.
Amostra 404	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.

A comparação das sequências do gene *p28* com a cepa de referência *E. canis* cepa Jaboticabal (EF014897) apresentou substituições de aminoácidos pontuais nas posições 81,

153, 154, 156 e 208 (Tabela 4), observadas de forma variável entre as amostras analisadas, que tiveram alta similaridade com a sequência de referência.

Tabela 4. Substituições de aminoácidos no gene *p28* de *E. canis* em comparação com a sequência referência EF014897.

Sequências	Posição do aminoácido				
	81	153	154	156	208
<i>E. canis</i> cepa Jaboticabal (EF014897)	P	S	S	S	P
Amostra 9 (PZ138104)	.	.	N	.	.
Amostra 26 (PZ138108)	.	.	.	N	T
Amostra 40 (PZ138110)	L	L	.	.	.

A análise de polimorfismos de nucleotídeos no gene *p28* de sequências de *E. canis* revelou a presença de 21 haplótipos distintos, com diversidade haplotípica (*Hd*) de 0,9632, diversidade nucleotídica (π) de 0,0731845 e 224 sítios polimórficos (S). Entre as amostras obtidas neste estudo, foram evidenciados nove haplótipos. A rede resultante revelou um cenário altamente diverso, caracterizado por múltiplos haplótipos exclusivos da microrregião de Unaí, separados de sequências exógenas por inúmeras etapas mutacionais. Nenhum haplótipo foi dominante, sendo que o mais frequente (Hap 4) esteve presente em apenas três amostras, evidenciando um padrão de dispersão genética (Figura 4). As sequências obtidas neste estudo associadas aos haplótipos, estão listadas na tabela disponível no anexo II.

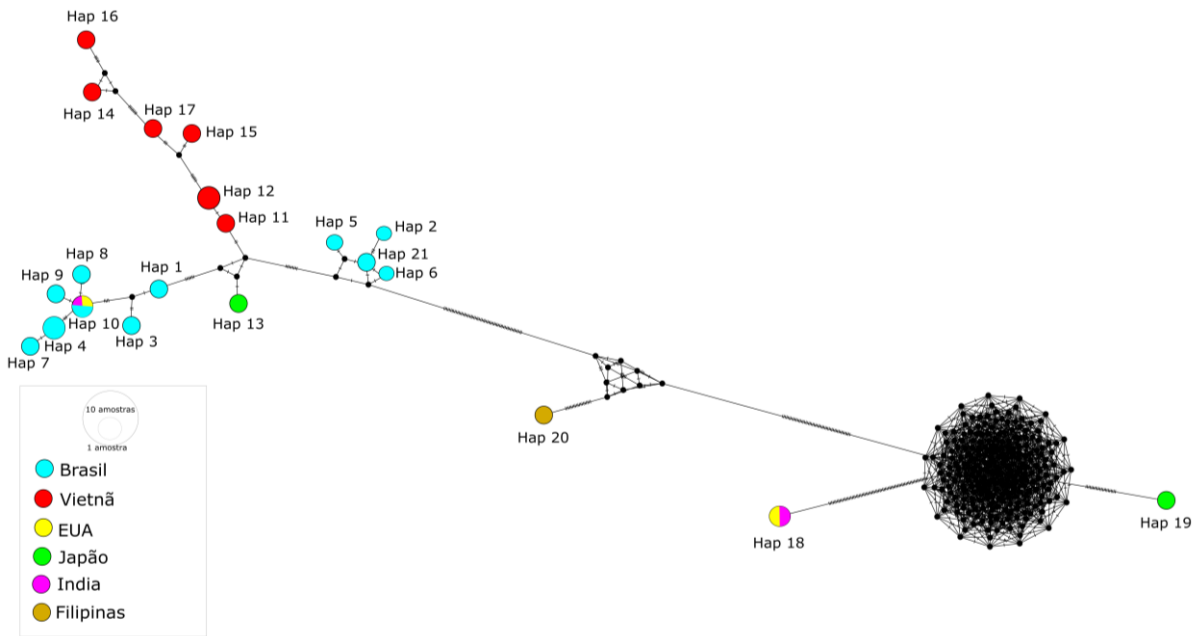


Figura 4. Rede de haplótipos median-joining baseada nas sequências de *p28* de isolados de *E. canis* detectados em Unaí (MG), Brasil, e em países estrangeiros. Pequenas diferenças entre os haplótipos representam ocorrências mutacionais. Os círculos pretos representam as características intermediárias causadas por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

Na análise de agrupamento do gene *p28*, foi possível observar que oito sequências do estudo se agruparam com sequências de *E. canis* do Rio de Janeiro, Brasil (PV157949; PV15794), Índia (PP690000) e Estados Unidos (CP000107). Em contrapartida, três amostras se agruparam com *E. canis* cepa Jaboticabal, Brasil (EF014897), evidenciando diversidade intraespecífica entre as sequências (Figura 5).

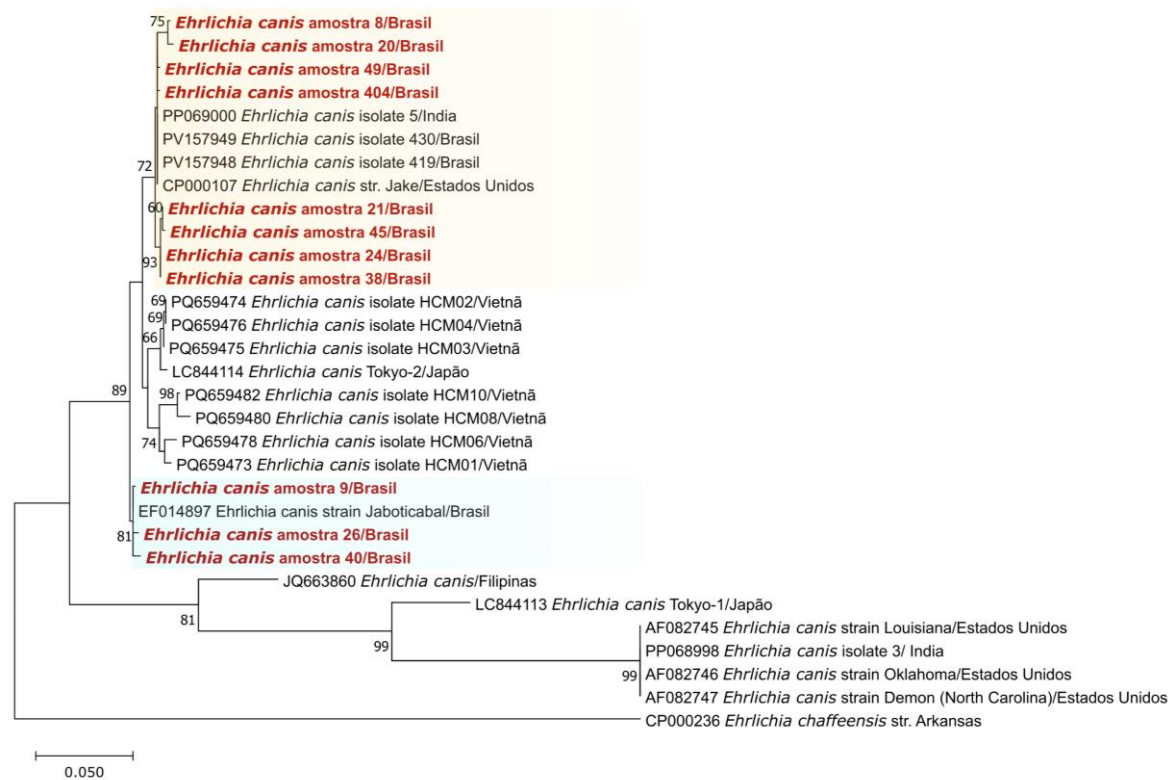


Figura 5. Árvore filogenética baseada em um fragmento do gene *p28* de cães da microrregião de Unaí, MG, Brasil, construída utilizando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura 3 parâmetros. Os valores de bootstrap são mostrados ao lado dos ramos. As diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios foram modeladas com uma distribuição Gama discreta (+G, parâmetro = 0,6816). A barra de escala indica o número de substituições por sítio. A análise incluiu 31 sequências e 792 posições de nucleotídeos alinhadas.

Na análise de identidade das sequências nucleotídicas obtidas a partir do gene *trp36*, as sequências geradas no presente estudo apresentaram identidade variando de 97% a 99% quando comparadas a sequências de *E. canis* disponíveis na base de dados Genbank provenientes de diferentes regiões geográficas (Tabela 5).

Tabela 5. Identidade entre as sequências de *trp36* de *E. canis* do estudo e sequências depositadas no Genbank.

Amostras	Localidade	Nº. acesso Genbank	Homologia (%)	Query coverage (%)
Amostra 20	<i>E. canis</i> / Colômbia	MN159544	99,63	100
Amostra 21	<i>E. canis</i> / Colômbia	MW229079	97,70	100
Amostra 26	<i>E. canis</i> / Colômbia	ON886370	99,86	100
Amostra 38	<i>E. canis</i> / Brazil	JX312078	98,38	100
Amostra 49	<i>E. canis</i> / EUA	DQ085427	98,09	100

Para a análise das sequências do gene *trp36*, os nucleotídeos foram traduzidos em aminoácidos para identificar a região de repetição em tandem. Quatro sequências codificaram nove aminoácidos (TEDSVSAPA) com o número de repetições variando entre 12 e 16 cópias. Enquanto, uma sequência codificou a região de tandem composta por oito aminoácidos (ASVVPEAE) com 13 repetições (Tabela 6).

Tabela 6. *Tandem repeat* e número de cópias entre as sequências de *trp36* de *E. canis* do presente estudo.

Amostras	<i>Tandem repeat</i>	Nº de cópias	Genogrupo
Amostra 20	TEDSVSAPA	16	EUA
Amostra 21	TEDSVSAPA	12	EUA
Amostra 26	ASVVPEAE	13	Brasil
Amostra 38	TEDSVSAPA	13	EUA
Amostra 49	TEDSVSAPA	12	EUA

Na análise filogenética do gene *trp36*, observou-se que quatro sequências obtidas neste estudo agruparam-se com sequências provenientes de diferentes países, pertencentes ao genogrupo americano (EUA), enquanto uma sequência agrupou-se com isolados brasileiros, pertencentes ao genogrupo BR (Figura 6). As amostras brasileiras, incluindo aquelas obtidas neste estudo e as previamente descritas na literatura, distribuíram-se em diferentes subclados.

Esse padrão de agrupamento sugere a existência de variação genética associada à distribuição geográfica dos isolados. A disposição das sequências na árvore filogenética evidencia a diversidade genética de *E. canis*, indicando a circulação de diferentes genogrupos, que parece variar de acordo com a região geográfica.

5. DISCUSSÃO

Embora a Erliquiose Monocítica Canina (EMC) seja amplamente descrita em diferentes regiões do Brasil, observa-se uma relativa escassez de estudos moleculares sobre a ocorrência do agente no estado de Minas Gerais, especialmente aqueles voltados à determinação de prevalência em populações caninas naturalmente infectadas. Nesse contexto, a prevalência de 3,1% utilizando o gene *p28* observada no presente estudo contribui fornecendo dados sobre a circulação de *E. canis* em Minas Gerais.

Estudos conduzidos no estado do Rio de Janeiro demonstram ampla variação na frequência de positividade para o agente da Erliquiose Monocítica Canina. Macieira *et al.* (2005), Ferreira *et al.* (2014) e Costa *et al.* (2019) identificaram, por meio de técnicas moleculares, taxas de positividade de 16%, 5% e 42,3%, respectivamente. Paulino *et al.* (2018), ao avaliarem a presença de *E. canis* na região sudeste do estado do Rio de Janeiro, identificaram prevalência de 24,8% em uma população de 390 cães. Quando comparados com dados de outras regiões do Brasil, observa-se que, em estudo realizado no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, localizado na região sul do município de São Paulo, 16,7% (9/54) dos cães foram positivos no diagnóstico molecular (Queiroz *et al.*, 2022). A variação na positividade observada entre os animais pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo condições climáticas, distribuição e densidade do vetor, características da população estudada, tipo de habitat e comportamento dos animais, além das diferenças metodológicas empregadas na detecção do agente (Dagnone *et al.*, 2001).

Uma limitação do presente estudo refere-se ao marcador molecular empregado para detecção do agente. Estudos prévios demonstraram que ensaios baseados no gene *p28* apresentam menor sensibilidade quando comparados a protocolos direcionados ao gene 16S rRNA em PCR nested e ao gene *dsb*. A PCR nested baseada em 16S rRNA pode detectar níveis equivalentes a uma monocitose infectada em 10^6 células, enquanto ensaios direcionados ao gene *dsb* já demonstraram capacidade de detecção de até 10 cópias de DNA de *E. canis*. Em contraste, a PCR baseada no gene *p28* apresenta limite de detecção aproximado de um parasita em 10^9 células, possivelmente em função do maior tamanho do fragmento amplificado, o que pode reduzir a eficiência da reação (Nakaghi *et al.*, 2010). Dessa forma, a ocorrência observada no presente estudo pode estar subestimada. Além disso, evidências recentes demonstraram elevada concordância entre resultados obtidos para os genes *dsb* e *p28*, reforçando a confiabilidade do marcador para fins filogenéticos e epidemiológicos (Chagas *et al.*, 2025). Assim, embora a sensibilidade analítica possa representar uma limitação para estimativas de prevalência, o uso do gene *p28* permanece relevante para a compreensão da variabilidade genética e da dinâmica populacional de *E. canis*.

No presente estudo, algumas amostras amplificaram para o gene *p28*, mas não para *trp36*. O locus *p28*, pertencente a uma família multigênica de proteínas de membrana externa, tende a favorecer a detecção de múltiplas cepas, enquanto TRP36 é uma proteína imunorreativa única, altamente variável, com extenso polimorfismo de repetições em tandem. Essa variabilidade genética aumenta o risco de incompatibilidades entre primer e molde, reduzindo a eficiência de amplificação para determinados genótipos (Chagas *et al.*, 2025).

A caracterização genética baseada no gene *p28* revelou diversidade entre amostras de *E. canis*, com variações que podem impactar diretamente o potencial imunogênico da proteína codificada. Essa diversidade também já foi demonstrada em um isolado de *E. canis* em Uberlândia –MG (Alves *et al.*, 2014) e em amostras de cães do estado do Rio de Janeiro (Costa *et al.*, 2019; Chagas *et al.*, 2025). Essa diversidade é consistente com a variabilidade previamente observada no gene *trp36*, sugerindo que ambas as regiões genômicas estão sujeitas a pressões evolutivas distintas, possivelmente decorrentes das interações com o sistema imunológico do hospedeiro. Alterações nesses genes têm sido associadas a impactos

significativos nas respostas imunes, podendo influenciar tanto a eficácia de potenciais vacinas quanto a sensibilidade de ensaios diagnósticos (Nakaghi *et al.*, 2010; Poolsawat *et al.*, 2023).

A diversidade genética dentro das populações de *E. canis*, avaliada principalmente por meio dos genes *trp36* e *p28*, revela significativa heterogeneidade regional. Em nosso estudo, identificamos dois genogrupos principais por meio da análise do gene *trp36*, dos quais 80% (4/5) pertenciam ao genótipo EUA e 20% (1/5) ao genótipo BR. A região de repetição em tandem “TEDSVSAPA” apresentou variação entre 12 e 16 cópias nas amostras do presente estudo. Comparativamente, estudos realizados no estado do Rio de Janeiro demonstraram menor variação, onde Ferreira *et al.* (2014) descreveram sequências com 5 a 8 cópias, Costa *et al.* (2019) relataram 11 cópias em diferentes mesorregiões, e Chagas *et al.* (2025) observaram sequências contendo de 5 a 12 cópias. Dados de outros países também evidenciam ampla diversidade, Zweygarth *et al.* (2014) registraram sequências com 7 (África do Sul 222), 8 (Espanha 105) e 16 (África do Sul 171) repetições em tandem, enquanto Arroyave *et al.* (2020) descreveram variação entre 10 e 19 cópias.

A sequência de repetição ASVVPEAE, característica do genogrupo BR, já foi descrita no Brasil com variação de 6 a 15 cópias (Aguiar *et al.*, 2013), enquanto cães colombianos apresentaram 15 cópias dessa repetição (Arroyave *et al.*, 2020). Estudos mais recentes, como o de Chagas *et al.* (2025), observaram uma faixa mais ampla, de 3 a 22 cópias. No presente estudo, a sequência analisada apresentou 13 cópias. É importante destacar que o número de repetições em tandem pode alterar a conformação da proteína, afetando sua função biológica e estrutura tridimensional (Alberts *et al.*, 2008). Além disso, essas variações estão intimamente relacionadas a interações funcionais entre o hospedeiro e o patógeno, incluindo adesão celular, internalização, nucleação de actina e mecanismos de evasão imunológica (McBride & Walker, 2011).

No presente estudo, essa diversidade foi reforçada pela identificação de nove haplótipos do gene *p28* em amostras provenientes do estado de Minas Gerais, evidenciando ampla variabilidade genética entre as amostras circulantes na região. Chagas *et al.* (2025) também evidenciaram elevada diversidade genética no estado do Rio de Janeiro, demonstrando a presença de 17 haplótipos. Em contraste, Poolsawat *et al.* (2023), ao analisarem a rede haplotípica de *E. canis* na Tailândia, observaram apenas três haplótipos, indicando diversidade significativamente menor quando comparada aos achados brasileiros. A maior variabilidade observada no presente estudo pode estar relacionada à circulação prolongada e simultânea de múltiplas linhagens de *E. canis* em um ambiente caracterizado por intenso fluxo de hospedeiros e vetores.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou baixa prevalência molecular de *E. canis* em Minas Gerais, mas revelou significativa diversidade genética nos genes *trp36* e *p28*. A variação observada nas regiões de repetição em tandem e nos haplótipos únicos evidencia fluxo gênico entre cepas. A co-circulação dos genogrupos BR e EUA reforça a complexidade genética do agente na região e a importância de monitoramento molecular contínuo. Este estudo contribui para o entendimento sobre a circulação molecular de *E. canis* em Minas Gerais, fornecendo dados inéditos sobre sua diversidade genética na região estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRANONIK, M.; HIRAKATA, V. N. Sample size calculation: proportions. **Revista HCPA**, v. 31, p. 382–388, 2011.
- AGUIAR, D. M.; RODRIGUES, F. P.; RIBEIRO, M. G.; DOS SANTOS, B.; MURARO, L. S.; TAQUES, I. I. G. G.; & TAKAHIRA, R. K. Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, p. 135-141, 2020.
- AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; PACHECO, T. A.; MENESES, A. M. C.; ZANUTTO, M. S.; ... & LABRUNA, M. B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 315-32, 2013.
- AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZHANG, X.; MELO, A. L.; BRAGA, I. A.; WITTER, R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, H. S.; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S.; LABRUNA, M. B.; & MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 537–544, 2014.
- AKTAŞ, M.; ÖZÜBEK, S. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 64, p. 20–24, 2019.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **How cells read the genome: from DNA to protein**. In: Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, p. 329-410, 2008.
- ALVES, R. N.; RIECK, S. E.; UEIRA-VIEIRA, C.; LABRUNA, M. B.; BELETTI, M. E. Isolation, *in vitro* propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an *Ehrlichia canis* strain from southeastern Brazil. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 241, 2014.
- ARROYAVE, E.; RODAS-GONZÁLEZ, J. D.; ZHANG, X.; LABRUNA, M. B.; GONZÁLEZ, M. S.; FERNÁNDEZ-SILVA, J. A.; MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia canis* TRP36 diversity in naturally infected dogs from an urban area of Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, p. 101367, 2020.
- BAHIENSE, C. R., DE MATOS, A. C., ABATE, H. L., DOS SANTOS, N. J. R., & VIDOTTO, O. Occurrence of *Babesia vogeli*, *Mycoplasma* spp., *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* spp. in a hospital dog population of western Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, p. 3133–3144, 2020.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, pp. 4172-4177, 2003.

BITTENCOURT, J., HIURA, E., SOBRAL, S. A., DE TOLEDO VIEIRA, F., BRAGA, F. R., TOBIAS, F. L., & LANGONI, H. A ocorrência de *Babesia* sp., *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães domiciliados, em dois municípios do estado do Espírito Santo–Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1-9, 2022.

BOUZA-MORA, L.; DOLZ, G.; SOLÓRZANO-MORALES, A.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J.; SALAZAR-SÁNCHEZ, L.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novo genótipo de *Ehrlichia canis* detectado em amostras de doadores de bancos de sangue humano na Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36–40, 2017.

CABEZAS-CRUZ, A.; VALDÉS, J. J.; DE LA FUENTE, J. The glycoprotein TRP36 of *Ehrlichia* sp. UFMG-EV and related cattle pathogen *Ehrlichia* sp. UFMT-BV evolved from a highly variable clade of *E. canis* under adaptive diversifying selection. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, 2014.

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

CHAGAS, J. D. R.; MAIA, D. S.; CORDEIRO, M. D. et al. High genetic diversity of *Ehrlichia canis* trp36 and p28 genes in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 49, p. 350, 2025.

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

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

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

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, 2010.

DANTAS-TORRES, F., CHOMEL, B. B., & OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

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

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

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

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

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 11, p. 540-543, 1992.

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

FERROLHO, J., ANTUNES, S., VILHENA, H., ANASTÁCIO, S., RAMALHO DE SOUSA, S., FROUCO, G., & DOMINGOS, A. The Complexities of Canine Monocytic Ehrlichiosis: Insights into *Ehrlichia canis* and Its Vector *Rhipicephalus sanguineus*. **Microbiology Research**, v. 16, n. 4, p. 85, 2025.

FONSECA, J. P.; HIRSCH, C.; GUIMARÃES, A. M. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. **Pubvet**, v. 7, p. 619–706, 2013.

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

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

HONORATO, S. M. **Estudo da infecção natural por *Ehrlichia canis* em cães no Distrito Federal e entorno**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-Graduação em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 59 p., 2021.

HSIEH, Y. C.; LEE, C. C.; TSANG, C. L.; CHUNG, Y. T. Detecção e caracterização de quatro novos genótipos de *Ehrlichia canis* em cães. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1–2, p. 70–75, 2010.

LONG, S. W., ZHANG, X. F., QI, H., STANDAERT, S., WALKER, D. H., & YU, X. J. Antigenic variation of *Ehrlichia chaffeensis* resulting from differential expression of the 28-kilodalton protein gene family. **Infection and immunity**, 70(4), 1824-1831, 2002.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

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

MACIEL, F. C. B., DA SILVA, J. B. O., & SANTO, E. F. E. Estudo retrospectivo da infecção causada por *Ehrlichia* spp. em cães de Manaus, Amazonas (2018-2020). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 2, p. 2056-2065, 2021.

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

McBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, 2011.

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

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

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

McBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 13–18, 2000.

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

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

- NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; 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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 75–79, 2010.
- NAVARRETE, M. G., HODŽIĆ, A., CORONA-GONZÁLEZ, B., CORDEIRO, M. D., DA SILVA, C. B., BÁEZ, L. C., & CABEZAS-CRUZ, A. Novel *Ehrlichia canis* genogroup in dogs with canine ehrlichiosis in Cuba. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 295, 2022.
- PAULINO, P. G.; PIRES, M. S.; DA SILVA, C. B.; PECKLE, M.; DA COSTA, R. L.; VITARI, G. V.; SANTOS, H. A. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 159, p. 135–142, 2018.
- PEREIRA, M. R.; OLIVEIRA SILVA, A.; RODRIGUES, P. H. C.; OLIVEIRA SALES, I.; SILVEIRA, J. A. G.; BASTOS, C. D. V. First molecular evidence of *Ehrlichia canis* vertical transmission in naturally infected female dogs in Brazil. **Veterinary Microbiology**, 2025.
- POOLSAWAT, N.; NOOROONG, P.; JUNSIRI, W.; WATTHANADIREK-WIJIDWONG, A.; SRIONROD, N.; SANGCHUAI, S.; MINSAKORN, S.; TAZAWA, K.; ANURACPREEDA, P. *Ehrlichia canis*: molecular characterization and genetic diversity based on the p28 and trp36 genes. **Research in Veterinary Science**, v. 155, p. 88–102, 2023.
- QUEIROZ S, AGUIAR D, SILVA JUNIOR E, REGGIANI D, CARVALHO T, AGOPIAN R, PEIXOTO JUNIOR K, CORTEZ A, MORAES FILHO J. Detection and Laboratory Findings due to *Ehrlichia canis* in dogs from the south area of São Paulo–SP, Brazil. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 2, n. 7, p. 1-5, 2022.
- RAMOS, C. A., RAMOS, R. A., ARAÚJO, F. R., GUEDES JR, D. S., SOUZA, I. I., ONO, T. M., & ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 58-62, 2009.
- RAR, V., GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution**. n. 11, p. 1842–1861, 2011.
- RODRIGUEZ, J. M. Detection of animal pathogens by using the polymerase chain reaction (PCR). **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 3, p. 287-305, 1997.
- ROZAS, J.; FERRER-MAT, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S. E.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299–3302, 2017.
- SAINZ, Á.; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S.; SOLANO-GALLEGU, L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, 2015.

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos, e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis***. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2003.

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

SOUSA, V. R. F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 46 f., 2006.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–687, 1992.

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

TAQUES, I. I. G. G.; BARBOSA, T. R.; DE CÁSSIA MARTINI, A.; PITCHENIN, L. C.; BRAGA, Í. A.; DE MELO, A. L. T.; DE AGUIAR, D. M. Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 47–50, 2016.

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

VIEIRA, R. F. D. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P. D.; SANTOS, R. P. D.; DUTRA, L. H.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2011.

ZHANG, C.; XIONG, Q.; KIKUCHI, T.; RIKIHISA, Y. Identificação de 19 genes polimórficos de proteínas da membrana externa principal e seus peptídeos imunogênicos em *Ehrlichia ewingii* para uso em um ensaio sorodiagnóstico. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 402–411, 2008.

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

ANEXOS

Anexo I. Parecer do CEUA/UFVJM autorizando a realização da pesquisa.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA
DIAMANTINA - MG**

CERTIFICADO

Diamantina, 06 de dezembro de 2021.

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção dos principais agentes patogênicos em animais de companhia da Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil", registrada com o nº 015/2021, sob a responsabilidade de Jenevaldo Barbosa da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de 17/11/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2022 a 31/12/2025
Espécie/linhagem/raça	Cães
Nº de animais	1025
Peso/Idade	14 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Clínica Pet Stop CNPJ: 04.380.904/0001-40 Rua Celina Lisboa Frederico, 372 - Bairro Centro, Unaí/MG - CEP: 38610-041

O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA/UFVJM durante a vigência do projeto.

Com o recebimento deste Certificado, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.

Alexandro Alúcio Rocha

TW9kZWxviHBcmVjZXIlgYXByb3ZhZG8gQ29uY2VhIENFVUEgMDU0MTQxMw==

SEI 23086.005825/2020-75 / pg. 1

Anexo II.

Tabela correspondência entre haplótipos do gene *p28* em amostras de *E. canis* de cães no estado de Minas Gerais, Brasil.

Nº amostra	Haplótipo
Amostra 8	Hap 1
Amostra 9	Hap 2
Amostra 20	Hap 3
Amostra 21	Hap 4
Amostra 24	Hap 4
Amostra 26	Hap 5
Amostra 38	Hap 4
Amostra 40	Hap 6
Amostra 45	Hap 7
Amostra 49	Hap 8
Amostra 404	Hap 9