

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

TESE

**Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Ehrlichia canis* em cães
domiciliados em municípios com diferentes altitudes no Estado do Rio de
Janeiro.**

Débora Martins dos Santos

2021



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

**Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Ehrlichia canis* em cães
domiciliados em municípios com diferentes altitudes no Estado do Rio de
Janeiro.**

Débora Martins dos Santos

Sob a Orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos

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

Seropédica, RJ
Agosto, 2021

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

Ficha catalográfica elaborada

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237a Santos, Débora Martins dos, 1988-
Aspectos epidemiológicos e moleculares de Ehrlichia
canis em cães domiciliados em municípios com
diferentes altitudes no Estado do Rio de Janeiro. /
Débora Martins dos Santos. - Seropédica, 2021.
80 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, 2021.

1. Erliquiose canina. 2. Hemoparasitose. 3.
Carrapatos. 4. Biologia Molecular. 5. Epidemiologia .
I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, orient. II.
Massard, Carlos Luiz, 1947-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.



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



ATA Nº 3858/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.061970/2021-47

Seropédica-RJ, 30 de agosto de 2021.

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

DÉBORA MARTINS DOS SANTOS

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

TESE APROVADA EM 30/08/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese.

(Assinado digitalmente em 03/09/2021 11:02)
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ###014#2

(Assinado digitalmente em 03/09/2021 20:58)
MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###034#8

(Assinado digitalmente em 30/08/2021 16:09)
SANDRA MARIA GOMES THOME
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ###257#5

(Assinado digitalmente em 06/09/2021 15:44)
ALINE MOREIRA DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ##.##.##.317-##

(Assinado digitalmente em 30/08/2021 14:40)
NATHALIE COSTA DA CUNHA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ##.##.##.207-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3858, ano: 2021, tipo: ATA, data de emissão: 30/08/2021 e o código de verificação: 96f1c8fac6

Dedico esta tese a minha mãe, por me mostrar todos os dias que a vida é cheia de batalha, erros e acertos, mas que eu mereço todo o amor do mundo independentemente dos resultados

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro não só pela oportunidade, como por ser meu lar por tanto tempo.

Agradeço aos colegas da equipe de coletas pela parceria e pelas risadas (as vezes de desespero) e aos tutores dos animais que participaram deste estudo por, na maioria das vezes, nos receberem de portas abertas. Este trabalho só foi possível graças a eles.

Agradeço aos colegas de laboratório pelo aprendizado e pelos ombros e ouvidos, em especial a Lucia Herràn, Leo Paulis, Patrícia Paulino, Tays Araújo e Thamyris Sampaio por me ensinarem e me acolherem tanto; a minha admiração por vocês é imensa. Agradeço ao meu orientador, Huarrisson Azevedo, pela orientação ao longo dos últimos anos.

Com toda a importância do mundo, eu agradeço aos meus amigos pela compreensão, acolhimento e por acreditarem em mim mesmo quando eu já não acreditava. Vocês sempre serão minha luz quando me encontro em momentos sombrios e por isso sou muito grata.

E por último, agradeço especialmente à minha mãe Carla, à Andréa Intrator, ao meu amor Gustavo Sales e aos meus irmãos Marcello e Bernardo Martins.

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

SANTOS, Débora Martins dos. **Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Ehrlichia canis* em cães domiciliados em municípios com diferentes altitudes no Estado do Rio de Janeiro.** 80p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

RESUMO

A Erlichiose Monocítica Canina é uma das doenças mais diagnosticadas na rotina da clínica veterinária de pequenos animais. O estudo objetivou analisar a epidemiologia e a variabilidade genética da sequência 16S rRNA de *Ehrlichia canis* em amostras de sangue de cães domiciliados em municípios do estado do Rio de Janeiro: Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis; em diferentes gradientes de altitude, pelo período de um ano. Um total de 456 amostras de sangue foram coletadas para análise epidemiológica e molecular. O DNA total foi extraído das amostras com a utilização do Kit comercial de extração DNeasy Blood & Tissue kit QIAGEN. As amostras de DNA foram submetidas a qPCR com alvo na sequência 16S rDNA, seguindo protocolo previamente descrito na literatura. Posteriormente, foram realizadas duas reações de PCR convencional, também descritas na literatura, objetivando caracterizar a sequência 16S rRNA das amostras positivas. No modelo de regressão logística, foi observada uma associação entre a frequência de cães positivos para *E. canis* e a altitude ($p<0.002$). Os cães domiciliados nos municípios de baixa altitude demonstram 2,18 vezes mais chances de infecção por *E. canis* quando comparados com os cães domiciliados em municípios de elevada altitude. As variáveis relacionadas ao acesso a ambiente urbano, infestação por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus s.l* e cães com raça definida também foram associados à presença do DNA de *E. Canis*. As variáveis ambientais como altitude, área de acesso dos cães, infestação por carrapatos e cães com raça explicam 73% a ocorrência de *E. canis* nas regiões estudadas. Esses resultados demonstram que a altitude exerce influência sobre os determinantes causais e a frequência da infecção por *E. canis* em cães nos municípios estudados, assim como as características intrínsecas ao cão. Na análise filogenética todas as sequências se agruparam dentro do clado de *E. canis*, o que demonstra que a sequência 16S rRNA é um excelente marcador filogenético para classificações taxonômicas. No entanto, por ser bastante conservado, não é tão bom para avaliar diversidades genéticas. As sequências provenientes das amostras coletadas no município de Teresópolis possuem maior variabilidade genética quando comparadas com as sequências obtidas no município de Paracambi. É possível que essa diversidade se dê por condições ambientais que ainda precisam ser elucidadas.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, epidemiologia, altitude, Análise filogenética.

SANTOS, Débora Martins dos. **Epidemiological and molecular aspects of *Ehrlichia canis* in dogs living in municipalities with different altitudes in the State of Rio de Janeiro.** 80 p. Thesis (Doctor of Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

ABSTRACT

Canine Monocytic Ehrlichiosis is one of the most diagnosed diseases in the routine of small animal veterinary clinics. The study aimed to analyze the epidemiology and genetic variability of the 16S rRNA sequence of *Ehrlichia canis* in blood samples from domiciled dogs in municipalities in the state of Rio de Janeiro: Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis; in different altitude gradients, for a period of one year. A total of 456 blood samples were collected for epidemiological and molecular analysis. A total of 456 blood samples were collected for epidemiological and molecular analysis. Total DNA was extracted from the samples using the commercial QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Extraction Kit. DNA samples were subjected to qPCR targeting the 16S rDNA sequence, following a protocol previously described in the literature. Subsequently, two conventional PCR reactions were performed, also described in the literature, aiming to characterize the 16S rRNA sequence of the positive samples. In the logistic regression model, an association was observed between the frequency of *E. canis* positive dogs and altitude ($p<0.002$). Dogs living in low-lying cities are 2.18 times more likely to be infected by *E. canis* when compared to dogs living in high-altitude cities. Variables related to access to an urban environment, infestation by *Rhipicephalus sanguineus* s.l. ticks and defined breed dogs were also associated with the presence of *E. canis* DNA. Environmental variables such as altitudes, access area for dogs, tick infestation and breed of dogs explain 73% of the occurrence of *E. canis* in the regions studied. These results demonstrate that altitude influences the causal determinants and frequency of *E. canis* infection in dogs in the studied municipalities, as well as the intrinsic characteristics of the dog. In the phylogenetic analysis, all sequences were grouped within the *E. canis* clade, which demonstrates that the 16S rRNA sequence is an excellent phylogenetic marker for taxonomic classifications. However, as it is highly conserved, it is not so good for assessing genetic diversity. The sequences from the samples collected in the municipality of Teresópolis have greater genetic variability when compared with the sequences obtained in the municipality of Paracambi. It is possible that this diversity is due to environmental conditions that still need to be elucidated.

Keywords: *Ehrlichia canis*, epidemiology, altitude, phylogenetic analysis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação do gênero <i>Ehrlichia</i> a partir de espécie, hospedeiro, vetores e sua distribuição mundial.....	3
Quadro 2. Sequências de <i>primers</i> e sonda para detecção molecular de <i>Ehrlichia canis</i> por PCR em tempo real a partir de amostras de DNA extraído de sangue de cães.....	24
Quadro 3. Sequência dos primers para amplificação da sequência completa do 16S rRNA de <i>Ehrlichia canis</i> descritos por Unver et al. (2001).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Positividade global e frequência segundo o município de infecção por <i>Ehrlichia canis</i> em cães através da PCR em tempo real nos municípios de Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis, RJ, Brasil.....	29
Tabela 2.	Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis biogeográficas na presença de DNA de <i>Ehrlichia canis</i> nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	32
Tabela 3.	Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis ambientais na presença de DNA de <i>Ehrlichia canis</i> nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	32
Tabela 4.	Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis comportamentais na presença de DNA de <i>Ehrlichia canis</i> nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	33
Tabela 5.	Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis intrínsecas na presença de DNA <i>Ehrlichia canis</i> nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	33
Tabela 6.	Análise de regressão logística das variáveis associadas com cães positivos para <i>Ehrlichia canis</i> através da reação de PCR em tempo real nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí (baixa altitude), Petrópolis e Teresópolis (alta altitude) no estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	34
Tabela 7.	Distância evolutiva média (distância-p) entre as sequências de 16SrRNA de <i>Ehrlichia canis</i> , obtidas de cães naturalmente infectados, dos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Teresópolis e Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	36
Tabela 8.	Matrix de distância evolutiva (distância-p) par-a-par entre as sequências de 16SrRNA de <i>Ehrlichia canis</i> , obtidas de cães naturalmente infectados nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Teresópolis e Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inclusão intracelular em monócito de cão de <i>Ehrlichia canis</i> em formato de mórula.....	8
Figura 2. Imagens das Zonas Rurais e interior de domicílio de coleta: A – Paracambi; B – Barra do Piraí; C – Teresópolis; D – Petrópolis.....	20
Figura 3. Imagens da Zona Urbana e interior de domicílio de coleta: A – Barra do Piraí; B-Teresópolis; C-Paracambi; D – Petrópolis.....	20
Figura 4. Organograma demonstrando a sequência de eventos no processo de coleta de amostra de sangue de cães dos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis, RJ, Brasil.....	21
Figura 5. Mapa de pontos de coleta e animais positivos nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí (baixa altitude), Petrópolis e Teresópolis (elevada altitude) no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	28
Figura 6. Mapa de densidade Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene 16S rDNA de <i>Ehrlichia canis</i> em região de baixada, médio Vale do Paraíba e Região Serrana do estado do Rio de Janeiro, período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	29
Figura 7. Frequência de cães positivos para <i>Ehrlichia canis</i> através da PCR em tempo real, segundo o mês de coleta no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.....	30
Figura 8. Organograma dos espécimes de carrapatos coletados separados por estágio, espécie e município. Fonte: Paulis, 2020.....	31
Figura 9. Árvore filogenética inferida pelo método de <i>Maximum Likelihood</i> a partir de sequências 16S rRNA de <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Neorickettsia</i> spp.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

EMC	Erlichiose Monocítica Canina
PTC	Panleucopenia Tropical Canina
pb	Pares de bases
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação da cadeia polimerase)
qPCR	<i>Polimerase Chain Reaction in real-time</i> (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SIG	Sistema de informação geográfica
SIRGAS	Sistema de Referenciamento geográfico das américas
µM	Micromolar
ml	Mililitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O gênero <i>Ehrlichia</i>.....	3
2.2. Classificação taxonômica de <i>Ehrlichia canis</i>.....	4
2.3. <i>Ehrlichia canis</i>: sua história e distribuição global.....	4
2.4. O vetor biológico de <i>Ehrlichia canis</i>.....	5
2.5. Ciclo biológico de <i>Ehrlichia canis</i>.....	7
2.6. Patogênese.....	8
2.6.1. Aspectos Clínicos.....	8
2.7. Epidemiologia de <i>Ehrlichia canis</i>.....	9
2.8. Diagnóstico.....	11
2.8.1. Hematologia.....	11
2.8.2. Esfregaço sanguíneo.....	12
2.8.3. Bioquímica sérica.....	12
2.8.4. Testes sorológicos.....	13
2.8.5. Isolamento.....	13
2.8.6. Detecção molecular.....	14
2.9. Geoprocessamento em estudos epidemiológicos.....	14
2.10. Análise filogenética de <i>Erllichia canis</i>.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Caracterização do espaço amostral.....	18
3.2. Tamanho da amostra.....	21
3.3. Coleta de amostras.....	21
3.3.1. Questionário epidemiológico.....	22
3.3.2. Avaliação clínica dos animais e coleta de ectoparasitos.....	22
3.3.3. Identificação morfológica do carrapato.....	23
3.4. Extração do DNA total.....	23
3.5. Qualificação do DNA total.....	23
3.6. Realização de PCR em Tempo Real (qPCR) para Detecção de <i>Ehrlichia canis</i>.....	24
3.7. PCR Convencional para amplificação da sequência 16S rRNA de <i>Ehrlichia canis</i> e sequenciamento.....	24

3.8. Análise espacial.....	25
3.9. Análise estatística.....	26
3.10. Análise filogenética.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Achados epidemiológicos.....	31
4.2. Achados filogenéticos.....	35
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE I.....	59
APÊNDICE II.....	60
ANEXO I.....	66

1. INTRODUÇÃO

Ehrlichia canis é o patógeno causador da Erlichiose Monocítica Canina (EMC). Esta doença acomete severamente cães e está distribuída por todo o globo. Nos últimos anos, o gênero *Ehrlichia* vem sendo estudado, principalmente, pelo seu potencial zoonótico e, por consequência, como uma forma de prever medidas para a saúde pública. Estudos epidemiológicos vem sendo realizados para a compreensão dos mecanismos de transmissão e dos fatores de risco associados a transmissão desta bactéria.

Com base em estudos, no Brasil, a detecção da infecção varia de 0,5 % a 50% (DANTAS-TORRES, 2008). Essas divergências decorrem devido a diversos aspectos, isto é, pela pluralidade de microclimas e biomas que são encontrados no País, transformando-o em um excelente laboratório de campo para a compreensão dos mais diversos fatores de risco para o desenvolvimento e a distribuição geográfica da infecção.

A maioria dos estudos epidemiológicos apontam para o vetor *Rhipicephalus sanguineus s.l.* como o principal fator de risco para presença de *E. canis* em cães. Este, por sua vez, chama a atenção por ter seu ciclo adaptado a ambientes urbanos e domiciliares (DANTAS-TORRES, 2015; PAULINO et al., 2018). A distribuição do carrapato é cosmopolita sendo mais frequente em regiões de climas tropicais e subtropicais. Porém, existe relatos de sua ocorrência em outros tipos de clima como o temperado, árido e semiárido (CICUTTIN et al., 2015; MALIK et al., 2018) em frequências menores ou de linhagens diferentes que podem possuir capacidades vetoriais diferentes para a transmissão de *E. canis* (MORAES-FILHO et al., 2015).

Alguns estudos relatam que diferentes altitudes e climas interferem na frequência do vetor e na sobrevivência entre os estágios de desenvolvimento do carrapato (larva, ninfa e adultos). Sabe-se que ambientes muito úmidos e com temperaturas mais amenas interferem no ciclo reprodutivo deste vetor (RANDOLPH, 2004). Nesse sentido, levantou-se a hipótese de que ambientes com gradientes diferentes de altitudes podem apresentar diferentes prevalências da infecção por *E. canis* por conta das variações ambientais encontradas.

Considerando que o relevo é capaz de interferir diretamente e indiretamente na umidade, vegetação, temperatura do ambiente, sensação térmica e biologia de vetores, o estudo foi desenhado para que envolvesse diferentes altitudes e que se analisasse de forma descritiva e multivariada os possíveis fatores de risco inerentes a infecção do cão por *E. canis* em cada região. O território do estado do Rio de Janeiro é contemplado com diferentes estratos de altitude, desde regiões que se encontra ao nível do mar, como também o 5º maior pico de altitude do país, tornando-se assim, um interessante cenário para nortear estudos

epidemiológicos que buscam relacionar gradientes de altitude e tudo aquilo que é inerente (clima, umidade, vegetação, vetores) à transmissão do agente patogênico.

O presente estudo objetivou avaliar a epidemiologia envolvida na frequência de *E. canis* em diferentes altitudes no estado do Rio de Janeiro e analisar a conservação das cepas a partir da sequência do 16S rRNA entre as amostras coletadas, individualmente, de quatro municípios dos municípios do estado.

1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Ehrlichia*

As bactérias do gênero *Ehrlichia*, assim como outras riquetsias, responsáveis pela ocorrência da erliquiose e anaplasmosse, são classificadas como proteobactérias alfa, sendo consideradas como intermediárias entre um vírus e a bactéria. Existem semelhanças com os vírus, pois, tais bactérias são organismos intracelulares obrigatórios. Entretanto, apresentam enzimas metabólicas, utilizam oxigênio e são suscetíveis a algumas drogas antibacterianas, além de apresentar parede celular (CABEZAS CRUZ et al., 2012; HARRUS et al., 2012).

Embora o gênero seja sabidamente composto por seis espécies, nomeadamente como *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium* e *Ehrlichia minasensis*, encontradas no mundo todo (Tabela 1), nos últimos 20 anos têm sido encontradas, a partir de análises moleculares, novas cepas que de forma preliminar, foram apontadas como possíveis novas espécies do gênero *Ehrlichia*. (CICUTTIN, 2017; CICUTTIN, 2020). Apesar de possuir uma distribuição cosmopolita, sua frequência é maior em regiões tropicais e subtropicais devido à distribuição geográfica de seus vetores (VIEIRA et al., 2011; CABEZAS-CRUZ et al., 2016; SAITO; WALKER, 2016).

Quadro 1. Classificação do gênero *Ehrlichia* a partir de espécie, hospedeiro, vetores e sua distribuição mundial.

Espécie	Hospedeiro	Vetor	Distribuição Mundial
<i>E. canis</i>	Família Canidae e humanos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l <i>Dermatocentor variabilis</i>	Cosmopolita; preferencialmente regiões tropicais e temperadas.
<i>E. chaffeensis</i>	Humanos, cães, veados, cavalos e roedores	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermatocentor variabilis</i>	EUA, Europa, América do Sul, América Central e Coréia.
<i>E. ewingii</i>	Cães, humanos	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Otobius megnini</i>	EUA, África e Coreia.
<i>E. muris</i>	Roedores, humanos	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Japão.
<i>E. ruminantium</i>	Ruminantes	<i>Amblyomma</i> spp.	África, Caribe,

<i>E. minasensis</i>	Ruminantes	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Brasil, Canadá, Paquistão, Malásia, China, Etiópia e África do Sul.
----------------------	------------	--	---

Fonte: Moura de Aguiar et al., 2019.

2.2. Classificação Taxonômica da *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis é uma bactéria altamente pleomórfica, com uma membrana externa fina. Consiste em um único cromossomo, contendo cerca de 1.315.030 nucleotídeos. Parasitam, especialmente, os monócitos de seus hospedeiros, onde se multiplicam por divisão binária (HARRUS et al., 2011). Estes parasitos são pertencentes a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia* e espécie *Ehrlichia canis*.

2.3. *Ehrlichia canis*: sua história e distribuição global

Donatien e Lestoquard (1935), descreveram uma riquetsia, até então desconhecida, observada em esfregaços sanguíneos de cães mantidos no Instituto Pasteur da Argélia, notando que estes parasitos eram encontrados exclusivamente no interior de monócitos. Nesse mesmo momento, observaram que cães infestados por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) apresentavam a infecção pela bactéria que foi denominada *Rickettsia canis*. Ao longo dos anos seguintes, a mesma bactéria foi descrita em cães em outras partes da África, no Oriente Médio e na Ásia por Ewing (apud HILDEBRANDT et al., 1973). O organismo foi renomeado em 1945 por Moshkovski em homenagem ao bacteriologista alemão Paul Ehrlich, passando a ser conhecido como *Ehrlichia canis* (MCDADE, 1990). No ano de 1963, Ewing e Buckner (apud HILDEBRANDT et al., 1973) relataram a ocorrência de *E. canis* em cães em Oklahoma, sendo esse o primeiro relato nos Estados Unidos da América. Foi relatada pela primeira vez no Brasil por COSTA et al. (1973) na cidade de Belo Horizonte e a EMC é considerada uma das principais doenças de rotina na clínica médica veterinária.

Apesar da ocorrência de *E. canis* ter sido descrita em várias partes do mundo, foi apenas na década de 1960 que a doença por ela causada foi caracterizada. A Pancitopenia Tropical Canina (PTC), como previamente a ECM foi nomeada, chamou a atenção de médicos veterinários e pesquisadores devido as altas taxas de mortalidade entre cães militares tanto britânicos quanto estadunidenses, desempenhando diferentes funções durante a Guerra do Vietnã. O carapato *R. sanguineus* s.l., transmissor de *E. canis* e *Babesia canis*, foi considerado o provável vetor da

doença. Entretanto, ainda existiam dúvidas quanto ao seu agente etiológico, em virtude das coinfeções apresentadas por alguns animais. A reprodução dos sinais clínicos da PTC em animais infectados experimentalmente, com *E. canis*, permitiu a conclusão sobre o agente etiológico da doença e, embora testes sorológicos não estivessem disponíveis na época para sua detecção, a identificação das características morfológicas nas células infectadas demonstrou que o organismo em questão era indistinguível daquele descrito por Donatiem e Lestoquard (HUXSOLL et al., 1970).

Desde o primeiro relato, em 1935, até os dias atuais a compreensão sobre *E. canis*, seus vetores e seu potencial zoonótico avançaram. No entanto, ainda é necessário aprimorar os conhecimentos sobre a patogênese, as formas eficazes de tratamento, além das estratégias para sua prevenção. Sua importância se deve principalmente ao fato de ser o principal agente causal de uma doença grave e potencialmente fatal para cães em todo mundo (LITTLE, 2010).

No Brasil, a frequência da infecção varia de 0,7% a 50%, dependendo da região do país que esteja em questão, bem como do quanto urbanizada é a área. De fato, Dantas-torres et al. (2018) relatou elevadas quantidades de casos em áreas urbanas do estado de Roraima, quando comparadas às áreas rurais do mesmo estado, enquanto no sul do estado do Paraná os resultados encontrados foram o oposto: maior frequência de casos em áreas rurais. Isso evidencia que os diferentes climas, biomas, aspectos culturais e socioeconômicos observados em um país de dimensões continentais como Brasil, apresentam variáveis capazes de gerar resultados bastante diversos.

2.4. O Vetor Biológico da *Ehrlichia canis*

Os carapatos duros, pertencentes à família Ixodidae são, sabidamente, os transmissores de *E. canis*. Embora haja relatos de detecção da bactéria em *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes turdus* na Coréia do Sul (KIM et al., 2003) e ter sido comprovado, experimentalmente, por Johnson et al. (1998) que *Dermacentor variabilis* consegue transmitir o patógeno, o principal vetor de *E. canis* que é o carapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (CRUZ et al., 2012).

Rhipicephalus sanguineus sensu stricto (s.s.) foi descrito por Latreille em 1806 (apud NAVA et al., 2015). Uma vez que a espécime-tipo tenha se perdido e, apesar da descrição fornecida por Latreille ser parca, vaga e não conter ilustrações, *R. sanguineus* s.s. é a espécie-tipo do gênero *Rhipicephalus* (PEGRAM et al., 1987a), e é a base para o que hoje denomina-se como complexo *sanguineus*. Esse complexo tem sido objeto de estudos morfológicos, genéticos e biológicos que foram capazes de ressaltar as disparidades existentes entre as 12 espécies que

o compõe (PEGRAM et al., 1987a; BURLINI et al., 2010; NAVA et al., 2015). De fato, até recentemente acreditava-se que apenas uma espécie do gênero *Rhipicephalus* era encontrada na América do Sul, questão que foi esclarecida por Szabó et al. (2005).

Encontrados em todo o mundo, principalmente entre as latitudes 50°N e 30°S, o fato desse ectoparasito apresentar preferência pelo cão como seu hospedeiro usual, facilitando sua distribuição globalmente (DANTAS-TORRES et al., 2010). Entretanto, é importante ressaltar que as mudanças climáticas, as modificações na ocupação do solo, a aproximação do ser humano em áreas de matas e florestas, o desmatamento e a facilidade de locomoção de pessoas e cargas pelo mundo são fatores que promovem alterações na distribuição de vetores como um todo, inclusive de *R. sanguineus* s.l., levando à ocorrência de doenças transmitidas por vetores em locais onde as mesmas não eram outrora observadas (DANTAS-TORRES, 2015; DANTAS-TORRES et al., 2007).

Em termos comportamentais, *R. sanguineus* s.l são carapatos adaptados a áreas internas, sendo, porém, capazes de sobreviver em ambientes externos desde que haja disponibilidade de abrigos (DANTAS-TORRES et al., 2010; PAULINO et al., 2018;). São carapatos de três hospedeiros, isto é, cada estágio de desenvolvimento de seu ciclo de vida requer um novo hospedeiro (URQUHART et al., 1998; WALKER et al., 2000; DANTAS-TORRES, 2010). São parasitos intermitentes, e passam a maior parte do seu tempo de vida no ambiente, estando expostos a fatores bióticos e abióticos, tais como predadores, umidade do ar e temperatura (RANDOLPH, 2004). Embora o hospedeiro de predileção de *R. sanguineus* s.l. seja o cão, são oportunistas e há relatos desses carapatos sendo encontrados em outros animais, como gatos, cabras, carnívoros selvagens, roedores, coelhos e até mesmo em humanos (YOSHIZAWA et al., 1996; WALKER et al., 2000; DANTAS-TORRES, 2008, MIRÓ et al., 2013).

Assim como outros carapatos ixodídeos, *R. sanguineus* s.l. passa por quatro estágios de desenvolvimento em seu ciclo de vida: ovo, larva, ninfa e adultos (DANTAS-TORRES, 2008). Larvas, ninfas e fêmeas adultas se alimentam somente uma vez, por períodos que variam em função do estágio em que se encontram, enquanto machos podem se alimentar múltiplas vezes e até mesmo se deslocar para outro animal que coabite o mesmo ambiente, além de serem capazes de permanecer no hospedeiro por longos períodos (LITTLE et al., 2007; DANTAS-TORRES, 2008; DANTAS-TORRES, 2010).

Embora as fêmeas adultas possam começar a se alimentar mesmo sem a presença de um macho adulto, o ingurgitamento só será completado após o acasalamento, permanecendo então no hospedeiro por um período cuja duração pode variar de 5 a 21 dias (PEGRAM et al., 1987b;

DANTAS-TORRES, 2008a). Uma vez ingurgitadas, as fêmeas se desprendem do hospedeiro e buscam um abrigo para realizar a digestão do sangue ingerido. De 3 a 14 dias após deixar o hospedeiro, ocorre a oviposição, cuja duração pode variar de 16 a 18 dias (DANTAS-TORRES et al., 2008a). Os ovos, cuja contagem pode chegar a até 4.000, são depositados de uma única vez, como uma massa contínua e ao final do período de postura ocorre a morte da fêmea (DANTAS-TORRES, 2008).

De acordo com Dantas-torres (2008), os ovos são depositados pelas fêmeas em locais próximos àqueles usados por seus hospedeiros para descanso, o que talvez seja um comportamento estratégico para que as larvas, após a eclosão dos ovos, sejam capazes de encontrar rapidamente um hospedeiro para se alimentar. A aquisição e transmissão de *E. canis* por *R. sanguineus* s.l ocorre de forma transestadial. As ecdises de cada fase ocorrem no ambiente e os períodos entre cada fase os carapatos permanecem em jejum, procurando locais como forro (BREMER et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2008).

2.5. Ciclo Biológico da *Ehrlichia canis*

Rhipicephalus sanguineus se infecta com *E. canis* durante seu estágio de larva ou ninfa após a ingestão de leucócitos infectados, ao se alimentar de um hospedeiro que esteja na fase aguda da doença (SMITH et al., 1976; LEWIS et al., 1977). Uma vez no organismo do artrópode, a bactéria se dissemina do intestino para a glândula salivar, onde será inoculada em um novo hospedeiro durante a alimentação do carapato e após penetrar no organismo do hospedeiro, a bactéria *E. canis* é fagocitada pelos monócitos. É importante ressaltar que monócitos infectados pela bactéria não permitem a ocorrência da fusão fagolisossomal, permitindo então que ocorra sua multiplicação – que ocorre por fissão binária – dentro dos limites do fagossomo. Ocorre a formação de corpúsculos iniciais, com tamanho de 1 a 2 μ m e a isso segue-se o crescimento adicional e multiplicação, culminando com a formação de mórulas (Figura 1). A liberação de *E. canis* na circulação ocorre durante o rompimento do monócito infectado ou liberação por exocitose, dessa forma o ciclo infeccioso intra-hospedeiro se repete (NYINDO et al., 1971).

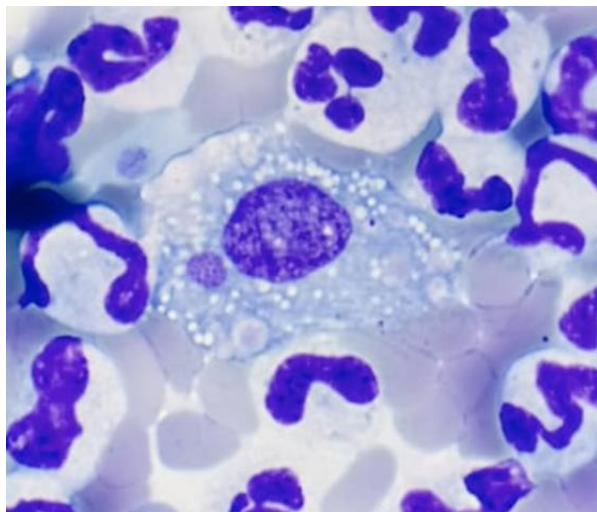


Figura 1. Inclusão intracelular em monócito de cão de *Ehrlichia canis* em formato de mórlula. Fonte: acervo pessoal de Roberta Tolomelli.

2.6. Patogênese

Apesar de possuir um genoma pequeno, a bactéria *E. canis* evoluiu de forma elaborada e complexa que a permitiu ser capaz de infectar um hospedeiro vertebrado e um invertebrado e ainda sobreviver no interior das células responsáveis pela imunidade inata dos hospedeiros (HARRUS, 2011). A condição de bactéria intracelular obrigatória que possui com as células de defesa (monócitos e macrófagos) como células-alvo, fez com que desenvolvesse vários mecanismos para driblar o sistema imunológico do hospedeiro (ALVES et al., 2013).

A patogênese da doença envolve efeitos diretos do patógeno e efeitos secundários causados por mecanismos imunomediados no processo de invasão das células hospedeiras por *E. canis*. Esses processos acontecem de forma cíclica: adesão, internalização, proliferação intracelular, exocitose e dispersão extracelular (HARRUS et al., 2015).

A internalização, a proliferação e o processo de dispersão da bactéria envolvem várias cascadas de sinalização específicas de cada espécie, culminando na realização de forma bem-sucedida da coleta de nutrientes, a evasão da destruição por lisossomos e a inibição do apoptose de células hospedeiras (MATHEMA et al., 2013; ALVES et al., 2013).

Alves et al. (2013), em um modelo experimental *in vitro*, mostraram que a actina do citoesqueleto na presença de cálcio e ferro está envolvida no processo da multiplicação intracelular de *E. canis*.

2.6.1. Aspectos clínicos

A EMC é uma doença multissistêmica e possui três fases distintas. A fase aguda dura de 2 a 4 semanas, a fase subclínica tem duração que varia de meses a anos e a fase crônica que não

possui um período bem esclarecido na literatura em animais naturalmente infectados. A distinção entre as fases em cães naturalmente infectados pode, entretanto, ser difícil (HARRUS et al., 2012; MILONAKIS, 2019). Deve-se ter em mente que as manifestações clínicas da doença podem ser afetadas em virtude da patogenicidade e da virulência da cepa infectante de *E. canis* e pela coinfeção por outros patógenos transmitidos por carrapatos, como *Babesia canis* e *Hepatozoon canis* (GAL et al., 2007; MILONAKIS, 2019).

De forma geral, cães com a doença aguda apresentam hipertermia intermitente, letargia, anorexia, depressão, linfadenomegalia, esplenomegalia e tendência a hemorragias. A ocorrência de lesões oculares também é frequente e podem ser observadas em uveíte anterior, papiledema, hemorragias de retina, coriorretinite e infiltrados perivasculares na retina (KOMNENOU et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2012; LAUZI, 2016; DARAMOLA 2017; MIKONASIS et al., 2019). Pode ocorrer também a manifestação de sinais neurológicos decorrentes de meningite ou sangramentos meníngeos, a doença pode progredir para a fase subclínica, durante a qual não há manifestações clínicas (WANER et al., 1997), ou passar direto para a fase crônica.

Os sinais clínicos apresentados na fase crônica podem ser semelhantes àqueles vistos na doença aguda, porém com maior gravidade. Os sangramentos se tornam mais proeminentes e podem ser observados quadros de hematúria, epistaxe severa, petequias e equimoses nas mucosas, assim como melena. Além da existência de manifestação clínica de alterações neurológicas, tais quais ataxia e convulsões, em decorrência de meningite ou de sangramentos meníngeos. Também podem ser observados edemas de membros e escroto (MYLONAKIS et al., 2019).

2.7. Epidemiologia de *Ehrlichia canis*

O patógeno tem distribuição mundial ocorrendo principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Estudos epidemiológicos apresentam sempre divergências em seus resultados, porque apesar de frequentemente existirem variáveis associadas à frequência do patógeno, essa associação somente poderá explicar aquele grupo específico estudado. Com o tempo e o aprofundamento dos estudos é possível traçar fatores de riscos que são mais comuns à presença do parasita e, a partir disto, traçar medidas de controle e prevenção. Vale observar que cada região possui características culturais, socioeconômicas, climáticas e geográficas únicas e que essas informações interferem diretamente na prevalência e nos fatores de risco associados.

Agentes patógenos transmitidos por vetores, como é o caso de *E. canis*, estão amplamente relacionadas à presença do vetor nas localidades e ao grau de infestação dos ambientes e hospedeiros. Países com uma prevalência maior geralmente estão associados com uma maior frequência do vetor ou a medidas de prevenção falhas, quer seja por falta de orientação populacional, quer seja por falta de recurso financeiro do tutor (MONTOYA-ALONSO et al., 2020; OJEDA-CHI et al., 2019; DANTAS-TORRES et al., 2018).

É amplamente estabelecido que o ambiente influencia diretamente na presença do vetor e da doença. Tanto o vetor quanto o patógeno deverão estar adaptados as condições ambientais para que consigam sobreviver e perpetuar sua própria espécie (SILVA et al., 2010). A resistência do patógeno no hospedeiro invertebrado (Ixodideo), por longos períodos, é fundamental para que ele consiga sobreviver e chegar ao seu hospedeiro definitivo (RANDOLPH, 2004).

Os principais fatores de risco associados à epidemiologia da Erlichiose estão relacionados de forma consistente com a presença do vetor (SOLANO-GALLEGO et al., 2006; COSTA JR. et al., 2007; BEALL et al., 2012; MIRCEAN et al., 2012; ORJUELA et al., 2015; BARRANTES-GONZALES et al., 2016; MITTAL et al., 2017; DARAMOLA et al., 2018; DA COSTA, 2018; DANTAS-TORRES et al., 2018; MIGLIORE et al., 2020).

A maior ocorrência do parasito está presente em regiões de clima tropical ou subtropical, onde o carapato *R. sanguineus* s. l é encontrado (MALIK et al., 2015). Países na Ásia, como a Índia, (MITTAL et al., 2017) relatam ocorrências entre 5,5 e 22% e o Paquistão entre 10 e 48% (MALIK et al., 2015); enquanto na África do Sul, são relatadas ocorrências que variam entre 12,5% e 22,7 % (KAMANI et al., 2013; DARAMOLA et al., 2018). No México, segundo Ojeda-chi et al. (2019) a detecção de *E. canis* varia de 33,1 até 74,3%. Na Espanha, os valores variam de 1 a 20% (MIRÓ et al., 2013; MONTOYA-ALONSO et al., 2020) e na Argentina, na América do Sul, foi encontrado um caso detectado com técnicas moleculares (LOPEZ et al., 2012; CICUTTIN et al, 2016); Uruguai e Bolívia ainda não haviam reportado casos até o ano de 2016 (CICUTTIN et al., 2016). Na Colômbia, encontrou-se uma frequência de 22% na região estudada (ORJUELA et al., 2015). No Paraguai, foi relatada uma frequência de 10,41% em um estudo realizado por Pérez-Macchi et al. (2018).

No Brasil, alguns estudos demonstram que a ocorrência de *E. canis* pode variar de 0,5 até 50% dependendo da localização estudada e a doença pode ser encontrada em todo o país, com exceção do estado do Rio Grande do Sul onde, até 2016 não havia sido registrado nenhum caso (MORAES-FILHO et al., 2015; CICCUTTIN et al., 2016).

Fatores intrínsecos ao cão como idade (COSTA JR et al., 2007; MIRÓ et al., 2013; ORJUELA et al., 2015; OJEDA-CHI et al., 2019), sexo (COSTA JR et al., 2007; ORJUELA et al., 2015; OJEDA-CHI et al., 2019;) e Raça (SOLANO-GALEGO et al., 2006; COSTAJR et al., 2007; ORJUELA et al., 2015; PAULINO et al., 2018; BARRANTES-GONZALES et al., 2019) têm apresentado associação com a presença do agente em cães.

Fatores ambientais como clima (MIGLIORE et al., 2020; MONTOYA-ALONSO et al., 2020), zona rural (KAMANI et al., 2013; MIRÓ et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2018), zona urbana (VIEIRA et al., 2013b; VIEIRA et al., 2015) e acesso à rua ou ambientes externos não controlados (MIRÓ et al., 2013; PAULINO et al., 2018; MONTOYA-ALONSO et al., 2020), também foram relatados como variáveis de associação com a infecção pelo patógeno.

2.8. Diagnóstico

O diagnóstico da EMC é uma prática complexa para o médico veterinário, pois requer a execução de uma boa anamnese, baseando-se tanto no clínico quanto no histórico do animal que irá fornecer base para raciocínio epidemiológico sobre quais doenças são prevalentes em áreas onde o paciente tem acesso (HARRUS, 2010; MALIK et al., 2015). O diagnóstico laboratorial é tradicionalmente feito por meio de esfregaços sanguíneos e testes imunológicos. O avanço de técnicas moleculares, entretanto, combinados com a alta eficiência, quando comparadas a outros métodos diagnósticos, fez com que o método de PCR convencional e PCR em tempo real passassem a ser consideradas ferramentas de diagnóstico rotineiramente utilizada na clínica médica veterinária (PAULINO et al., 2018). A escolha do método para realização do diagnóstico laboratorial irá se basear na fase da doença em que o animal se encontra (HARRUS et al., 2010; LITTLE, 2010).

2.8.1. *Hematologia*

A avaliação do perfil hematológico é de fundamental importância para o diagnóstico da EMC. Durante a fase aguda da doença é comum observar a ocorrência de trombocitopenia, que pode variar de moderada a severa, além da possibilidade de ser acompanhada por anemia e diminuição da contagem de leucócitos globais quando comparada a valores anteriores a infecção.

Experimentalmente, a trombocitopenia começa a se tornar significativa por volta do décimo dia de infecção, com progressão acentuada até a terceira semana da infecção quando a contagem de plaquetas atinge valores entre 20.000/ μ L e 52.000/ μ L. Na fase subclínica, a trombocitopenia pode estar presente mesmo sem a manifestação de sinais clínicos. Valores em

torno de 140.000/ μ L ou menores são descritos por Harrus, 2011 e Rodrigues-Vivaz (2015). A contagem global de eritrócitos e leucócitos também pode se apresentar reduzida, porém sem evidências ou manifestações clínicas. Na fase crônica, observa-se acentuada pancitopenia, em virtude da hipoplasia da medula óssea. A contagem de plaquetas é um importante marcador para a triagem de animais em regiões endêmicas. O esfregaço sanguíneo com a contagem diferencial de células e a contagem de plaquetas é, entretanto, obrigatório para confirmar a presença de trombocitopenia (HARRUS, 2010; RODRIGUES-VIVAZ, 2015).

2.8.2. *Esfregaço sanguíneo*

O esfregaço sanguíneo é uma ferramenta diagnóstica bastante interessante para a detecção de mórulas de *E. canis* no interior de monócitos. (DARAMOLA, 2017; DAGNONE, 2009). Entretanto, Woody e Hoskins (1991) ressaltaram que a sensibilidade da técnica era de cerca de 4%, e recomendaram a avaliação de pelo menos 1.000 campos do esfregaço, como forma de aumentar as chances de identificação de mórulas. Esse tipo de conduta demanda perícia do técnico e leva muito tempo. Além disso, outra limitação apresentada por essa técnica é que outras bactérias intracitoplasmáticas também são capazes de formar mórulas no interior de monócitos, o que dificulta a identificação, sinalizando que a técnica ainda sofre de baixa especificidade. É possível, ainda, que o operador seja confundido por plaquetas, grânulos autofílicos de linfócitos e material nuclear fagocitado, acreditando se tratar de inclusões de *E. canis*, aumentando a chance de erros em diagnósticos feitos por essa técnica (HARRUS et al., 2010).

2.8.3. *Bioquímica sérica*

As alterações nos exames de bioquímica sérica são simples e inespecíficas, sendo comum observar hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia na EMC. Aumentos discretos da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FALC) são frequentes em cães durante a fase aguda da doença (HARRUS et al., 2011). Pode ocorrer também um aumento da concentração de proteínas de fase aguda em períodos em que ocorrem manifestações clínicas da doença. Já as concentrações da proteína C-reativa demonstraram aumento entre os dias 4 e 16 da infecção e atingiram o pico entre 15 e 42 dias após a inoculação de *E. canis* em cães (SHIMADA et al., 2002). Em outro estudo, os níveis de alfa-1-glicoproteína-ácida (AGP) aumentaram de duas a nove vezes em um período de quatro a seis dias após a infecção experimental por *E. canis* e esses mesmos níveis diminuíram gradativamente até atingir valores de pré-exposição por volta do 34º dia após a inoculação da bactéria (RIKIHISA et al., 1994). A

bioquímica sérica, nesse sentido, teria um papel mais relevante para o acompanhamento clínico dos animais doentes do que para um diagnóstico da infecção.

2.8.4. Testes sorológicos

McBride et al. (2003) relatam que o diagnóstico a partir da detecção de imunoglobulina M (IgM) não é indicado devido ao desenvolvimento inconsistente de anticorpos IgM no curso da doença. Já os anticorpos IgG (imunoglobulina G) podem permanecer no organismo por um período de meses a anos após o tratamento e eliminação da riquetsia do organismo (BARTSCH; GREENE, 1996). Por esse motivo, o teste de imunofluorescência indireta (IFI) para anticorpos IgG anti-*E. canis* é considerado o teste padrão-ouro, indicando que houve exposição a *E. canis*. Entretanto, esse teste sorológico não é capaz de diferenciar entre anticorpos produzidos contra *E. canis*, *E chaffeensis*, *E. ewingii* e *E. ruminantium*, o que significa que apesar da excelência da técnica, ela apresenta algumas limitações diagnósticas como não poder definir qual o agente causador da doença ou determinar se o animal permanece infectado com o patógeno ou se a infecção já foi debelada (DARAMOLA et al., 2017; CICUTTIN et al., 2016). Por esses motivos, não deve ser utilizado como a única ferramenta de diagnóstico para *E. canis*, especialmente se o objetivo final for determinar a eficácia de um tratamento ou se o animal permanece infectado pelo agente causador.

Além da IFI, os testes imunoenzimáticos do tipo ELISA são bastante úteis no diagnóstico da doença. Testes rápidos laboratoriais como o 3Dx® e, posteriormente o 4Dx® (ambos da IDEXX Laboratories) foram desenvolvidos e têm utilizados com frequência na rotina clínica da medicina veterinária, sendo baseados na utilização de peptídeos sintéticos derivados das principais proteínas imunodominantes de *E. canis*, a P30 e a P30-1 (HARRUS et al., 2002). Apesar da praticidade, esses testes não são considerados relevantes na clínica quando utilizados isoladamente sendo necessário associá-los aos sinais observados, à contagem global de plaquetas ou a outros testes de diagnóstico (KUKRETI et al., 2018). É necessário lembrar que outros agentes podem causar reações cruzadas em testes sorológicos (NAVARRETE et al., 2018), e informações epidemiológicas são de fundamental importância para a relevância e a escolha de cada teste.

2.8.5. Isolamento

A linhagem de macrófagos caninos DH82 vem sendo utilizada com sucesso para cultivar *E. canis*, e foi bastante útil para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas como os testes de IFI, além de aprimorar as pesquisas sobre a EMC (LOVERING et al., 1980). Apesar dos

avanços permitidos pelo seu uso, essa é uma técnica laboriosa que demanda tempo, mão de obra especializada e equipamentos específicos tornando-a economicamente inviável para aplicação na rotina de diagnóstico. Esses fatores terminaram por ser limitantes ao seu uso como instrumento de diagnóstico na clínica médica veterinária, restringindo-a principalmente ao uso como ferramenta de pesquisa (HARRUS, 2011).

2.8.6. *Detecção molecular*

Os métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de sequenciamento do material genético podem ser usados para detectar e caracterizar o DNA de *E. canis* em uma amostra (CICUTTIN et al., 2015; DARAMOLA et al., 2017; KUKRETI et al., 2018). Apesar da sensibilidade do método, podem ocorrer resultados falso-negativos em algumas situações; no caso do PCR, um resultado falso-negativo não implica necessariamente que o DNA-alvo não esteja presente na amostra, indicando apenas que ele não foi detectado no material utilizado.

Segundo Iqbal et al. (1994), o DNA do parasito pode ser recuperado de forma mais otimizada entre 4 e 10 dias após a infecção do hospedeiro. Porém, sabe-se que é possível recuperar o DNA da bactéria por períodos mais longos após a infecção. Os exames de PCR baseados na porção 16S do RNA ribossomal (16s rRNA) e no gene *P30* são os mais comumente usados, sendo o último mais sensível que o primeiro (STICH et al., 2002). A avaliação de PCR, utilizando como amostra o baço, é mais sensível à avaliação de permanência de infecção após o tratamento quando comparado ao sangue e a medula óssea (HARRUS, 2011).

Exames de PCR quantitativo, em tempo real (qPCR), são mais sensíveis do que exames de PCR convencionais, além de permitir a quantificação da carga bacteriana pela intensidade de amplificação de cópias presentes no material genético (BANETH, 2009; PELEG et al., 2010). Em seu favor, o qPCR é menos suscetível à contaminação, que mesmo quando presente é facilmente detectável pela análise da curva de dissociação. Em virtude das vantagens apresentadas, o exame de PCR em tempo real tornou-se o método de eleição para a detecção de *E. canis* (PAULINO et al., 2018).

2.9. Geoprocessamento em Estudos Epidemiológicos

O geoprocessamento é uma área de conhecimento multidisciplinar que envolve ciências como a cartografia, a geografia e a estatística e faz uso de sistemas de informações gráficas (SIGs). O SIG é um sistema baseado em computador para planejar, armazenar e analisar conjuntos de dados digitais georreferenciados (NORSTROM, 2001); esses sistemas permitem

a visualização de mapas georreferenciados juntamente com as informações que se pretende abordar.

Os SIGs têm se tornado uma importante ferramenta para a epidemiologia e a saúde pública de um modo geral, pois possibilita a junção de dados socioeconômicos, de saúde e ambientais em um grupo de bases espaciais (BARCELLOS; BASTOS, 1996). Esses sistemas são capazes de construir uma relação entre a ecologia e a doença, e permitem de certa forma, criar um modelo para prever a distribuição espacial da doença, ou dos agentes etiológicos, ou até mesmo dos vetores em função dos dados obtidos e computados no sistema.

Segundo Durr e Gatrell (2004), o SIG vem se tornado uma importante ferramenta nas áreas da saúde e nas ciências parasitológicas, principalmente para os estudos que envolvem as doenças transmitidas por vetores. Análises espaciais podem gerar mapas com a distribuição das doenças revelando informações em termos de direção, intensidade e se determinada doença possui a probabilidade de expansão para outras regiões, tornando-se uma ferramenta fundamental para detectar, mitigar possíveis surtos (DELMELLE et al., 2014).

A contribuição de análises espaciais exploratórias, incluindo mapas de pontos e mapas de densidade, estimada de Kernel para monitorar doenças é bastante documentada na literatura. (DELMELLE et al., 2014; MRLJACK et al., 2017). Mrilack et al. (2017), confeccionaram mapas de calor de Kernel para a demonstração dos pontos de doenças transmitidas por vetores em cães. Os mapas de Kernel são um tipo de análise espacial amplamente utilizado para atuar, principalmente, quando existe sobreposição de pontos, tornando a distribuição do espaço amostral mais suave e permitindo uma visualização melhor do número de casos de forma regional ao invés de pontual. Trata-se de um método não paramétrico de curvas de densidade, onde o núcleo é o ponto que aparece a maior densidade e as curvas de densidades são geradas a partir da distância em relação ao núcleo (WEBER; WOLLMAN, 2016).

Jain e Kumar (2017), se basearam na utilização de ferramentas de densidade e geoprocessamento para relacionar o aparecimento de sintomas de doenças transmitidas por mosquitos (Dengue, Chikungunya e Malária) em função do tempo, utilizando as mídias sociais para a coleta de dados. O modelo de geoprocessamento desenvolvido foi capaz de construir um mapeamento preditivo do aparecimento dos sintomas em determinadas regiões da Índia.

A Organização Mundial de saúde (OMS) tem utilizado as ferramentas de análise espacial e geoprocessamento (SIG) para realizar programas de medidas de prevenção, determinar a epidemiologia de determinadas doenças em regiões do globo e planejar medidas de intervenção a partir dos resultados (WHO, 2010).

Allen e Wong (2006), utiliza técnicas de geoprocessamento para exemplificar como o SIG juntamente com análises estatísticas espaciais são ferramentas importantes na análise e na gestão de doenças transmitidas por vetores. No seu estudo, o vírus do Nilo ocidental, um arbovírus transmitido por mosquitos, é utilizado para ilustrar os modelos que relacionam técnicas para identificar áreas de acasalamento dos mosquitos com o risco da doença na população.

Os estudos relacionados à utilização de geoprocessamento em hemoparasitoses de cães ainda são escassos; no entanto, a facilidade de acesso a bases de dados de informações geográficas, socioeconômicas e demográficas fornecidos por órgãos, como o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. A implementação de modelos de estudo que propõe o conceito de Saúde Única. (*One Health*) e a facilidade de acesso a softwares gratuitos para o desenvolvimento desse tipo de pesquisa vem tornando cada vez mais possível a utilização destas ferramentas de custo baixo e que auxiliam, em grande parte, no entendimento e na prevenção de hemoparasitoses.

2.10. Análise Filogenética de *Ehrlichia canis*

A expansão da quantidade de material genético sequenciado na última década vem construindo uma filogenia robusta e permitindo uma classificação taxonômica mais exata. O desenvolvimento de uma adequação da taxonomia dos microrganismos é importante para descrever corretamente a diversidade microbiana, para auxiliar na interpretação de dados metagenômicos e, principalmente, para permitir que exista uma uniformização da linguagem para comunicar dados científicos (PARKS et al., 2017).

As árvores filogenéticas baseadas em sequências fornecem uma estrutura para o desenvolvimento de uma taxonomia que leve em conta não só as relações evolutivas como também as diferentes taxas de evolução entre os organismos.

A sequência 16S rRNA é uma ferramenta importante na identificação e na classificação genotípica das cepas de *E. canis* e é uma das macromoléculas mais utilizadas para traçar a evolução de procariontes (SIARKOU et al., 2007). Uma característica desta sequência é que apesar do patógeno ter uma ampla distribuição mundial, ele permanece bastante conservado entre as cepas o que torna essa sequência uma boa ferramenta para classificações taxonômicas, apesar de não ser tão indicada para avaliar variabilidades genéticas. (SIARKOU et al., 2007; MAEKAWA et al., 2017).

Outros importantes marcadores moleculares para *E. canis* são as *groEL*, *dsb*, *gltA*, *gp200*, *gp32*, *gp36* (AGUIAR, 2019). Estes, quando combinados com a sequência 16S permitem uma

avaliação mais profunda das divergências entre as cepas, avaliando regiões mais conservadas e outras não tão conservadas assim de modo a permitir estudos moleculares mais completos. (MAEKAWA et al., 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo epidemiológico e molecular, que contou com a participação de cães provenientes de diversas regiões do estado do Rio de Janeiro, foi necessária a submissão do projeto ao Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ), aprovado sob número 3915240616.

3.1. Caracterização do Espaço Amostral

Foram selecionados quatro municípios do estado do Rio de Janeiro com diferentes gradientes de altitude: Paracambi e Barra do Piraí, com uma altitude média de até 600 metros e Petrópolis e Teresópolis, com altitude média acima de 600 metros de altitude. Esses municípios foram selecionados porque atendiam aos critérios de altitude, e possuíam proximidade com a sede do laboratório. As coletas foram realizadas mensalmente nas zonas rurais (Figura 2) e urbana (Figura 3) de cada município no período de um ano (de novembro de 2018 até outubro de 2019).

Para que uma área fosse considerada zona rural, a propriedade deveria atender ao menos dois dos critérios descritos a seguir: estar localizada em regiões com menor densidade populacional quando comparadas ao centro comercial da cidade, possuir criações agropecuárias e/ou produções agrícolas, possuir pavimentação precária, regiões com sítios, fazendas e áreas de matas.

Considerou-se como zona urbana, regiões com uma maior densidade populacional no município, áreas de concentração comercial, áreas com maior aglomerado de residências e com maior facilidade de acesso, como pavimentação das ruas e calçadas e maior número de linhas de ônibus.

Os municípios selecionados foram separados em dois grupos de acordo com a altitude média de cada município. No Grupo de baixa altitude incluem-se Barra do Piraí e Paracambi (até 600 metros de altitude) e no Grupo de alta altitude, incluem-se Petrópolis e Teresópolis (altitudes acima de 600 metros). A caracterização dos municípios encontra-se abaixo:

O município de Barra do Piraí está situado na região do Vale do Paraíba do Sul, interior da Região Sul-fluminense do estado do Rio de Janeiro e no Censo do IBGE de 2018, contava com uma população de aproximadamente 100.000 habitantes. Apesar do crescimento urbano, o município se beneficia principalmente de atividades agrícolas, industriais, metalomecânicas e pecuárias. A economia baseia-se também no comércio, atendendo a diversos distritos da região. Ocupa o 20º lugar no estado do Rio de Janeiro em índice de desenvolvimento humano (IDH).

Localiza-se a uma latitude 22°28'12" Sul e a uma longitude 43°49'32" Oeste, estando a uma altitude média de 363 metros acima do nível do mar. Apresenta temperatura média de 21,4°C com oscilação média de 6,4°C. A pluviosidade média do município é de 1594mm e a precipitação média varia cerca de 250mm entre o mês mais seco e o mais chuvoso do ano.

O Município de Paracambi pertence à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Localiza-se a 22°36'39" de Latitude Sul e 43°42'33" de Longitude Oeste. Sua população estimada pelo censo de 2018 do IBGE é de estimada é de 52.683 habitantes. Ocupando o 33º lugar em IDH do estado, o clima se caracteriza como tropical e possui uma altitude média de 54 metros acima do nível do mar. A economia é baseada em comércio local, agricultura e pecuária. Tem como temperatura média 22,1°C, sendo a temperatura média no mês mais frio do ano 18,7°C. Quanto a sua pluviosidade média anual é de 1594mm com uma média de 281mm nos meses mais úmidos e 50mm no mês mais seco.

O Município de Petrópolis fica situado na Região Serrana fluminense e possui uma estimativa de 305.687 habitantes. Sua economia se baseia principalmente em turismo, na produção de cervejas e têxtil. Petrópolis ocupa o 11º lugar em IDH do estado. O clima é o tropical de altitude, com verões úmidos e quentes e invernos secos e relativamente frios. O alto relevo, formado por montanhas de grandes altitudes, tem grande influência no clima do município. A altitude média é de 838 metros acima do nível do mar e sua temperatura média é 19,6°C e apresenta 1917mm como pluviosidade média anual (CLIMATE.DATA.ORG).

O Município de Teresópolis é caracterizado como o município mais alto do estado, atingindo uma altitude média de 871 metros acima do nível do mar. O clima é o tropical de altitude e uma das características do município é a temperatura fria. As coordenadas são Latitude: 22° 24' 44" Sul, Longitude: 42° 57' 59" Oeste. Ocupa o 23º lugar em IDH do estado do Rio de Janeiro. Sua população está estimada em 180.000 habitantes, apesar de ter uma economia agrícola forte, a principal fonte do PIB de Teresópolis é o setor terciário. A pluviosidade média anual é 2081mm, atingindo 325mm de precipitação nos meses mais chuvosos e 60mm no mês mais seco.



Figura 2. Imagens das Zonas Rurais e interior de domicílio de coleta: A – Paracambi; B – Barra do Piraí; C – Teresópolis; D – Petrópolis.

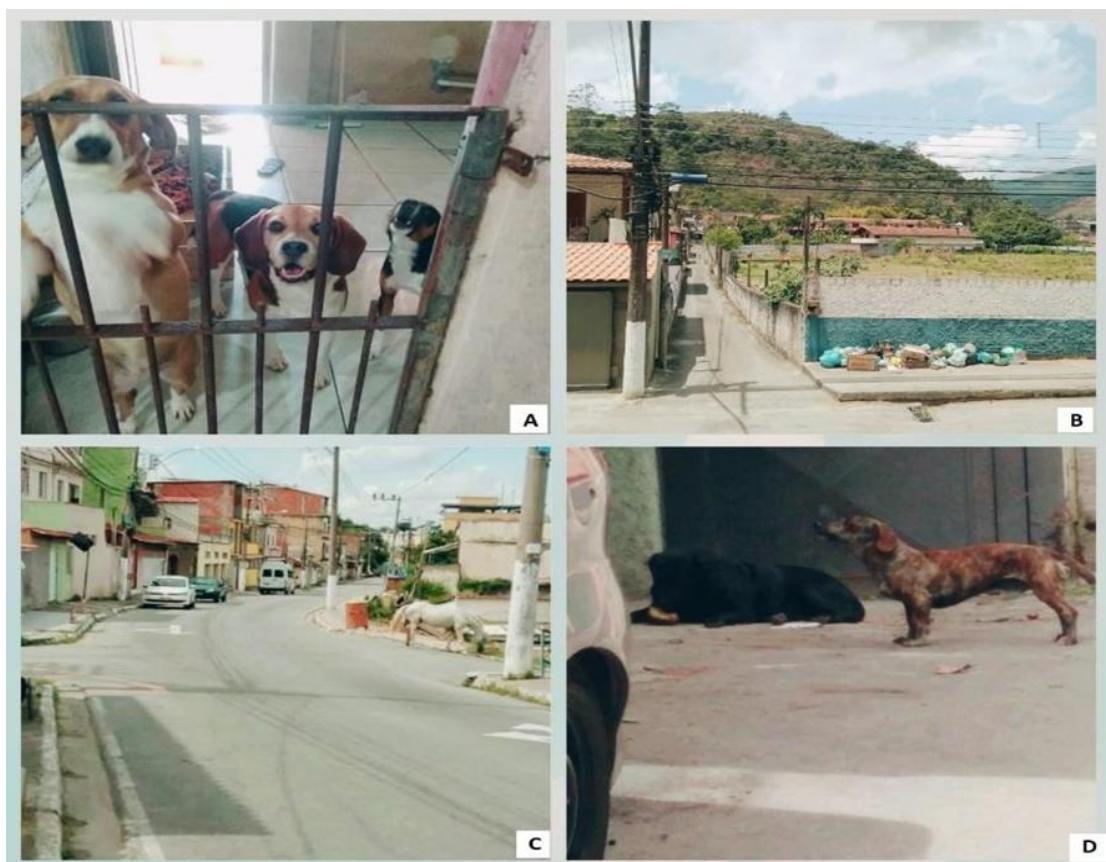


Figura 3. Imagens da Zona Urbana e interior de domicílio de coleta: A – Barra do Piraí; B-Teresópolis; C- Paracambi; D – Petrópolis.

3.2. Tamanho da Amostra

Para a determinação do tamanho da amostra foram levados em consideração parâmetros de uma população infinita para um nível de prevalência esperada de 50%, um erro amostral de 5% e admitindo um nível de significância de 95% (FULGÊNCIO, 2006), utilizando a fórmula:

$$N = \frac{p(100 - p) \cdot \alpha^2}{(d.p / 100)^2}$$

Sendo: N = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita; p = prevalência esperada; α^2 = fator determinante do grau de confiança; d= erro amostral.

A equação resultou de um N amostral de 384 cães. No presente estudo, foi coletado um total de 456 amostras distribuídas nos quatro municípios como pode ser observado no organograma abaixo (Figura 4):

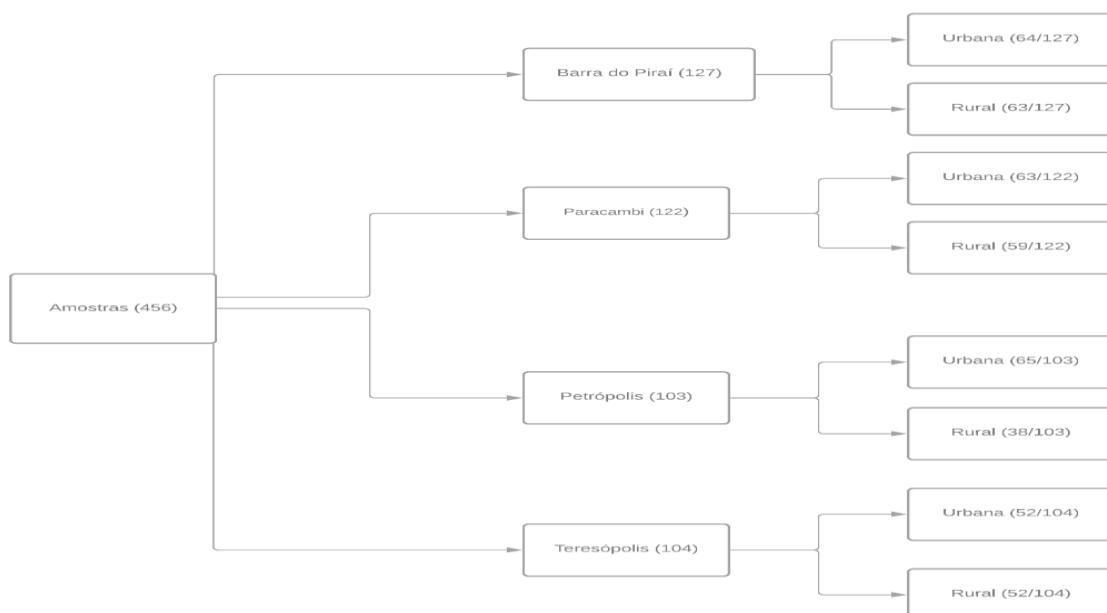


Figura 4. Organograma demonstrando a sequência de eventos no processo de coleta de amostra de sangue de cães dos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis, RJ, Brasil.

3.3. Coleta de Amostras

As coletas foram realizadas entre o período de novembro de 2018 até outubro de 2019 nas zonas rurais e urbanas das cidades. Foi utilizada a ferramenta de mapas do Google para a seleção das zonas rurais e urbanas. As residências foram escolhidas por conveniência e as amostras foram coletadas apenas nas residências onde o tutor responsável pelo animal assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I) consentindo em participar do estudo.

O tutor recebeu explicação do projeto pela equipe, e participou de uma entrevista respondendo a um questionário epidemiológico (APÊNDICE II). Apenas um animal era selecionado por residência e o critério utilizado para a seleção do animal foi sorteio.

Foi coletado cerca de 3 ml de sangue por punção periférica da veia cefálica utilizando-se seringa de 3ml e agulhas de 25mm. Desses 3 ml, cerca de 2,5 ml foram coletados em tubos de EDTA e os 0,5ml de sangue foram coletados em tubos próprios, sem anticoagulante, para a obtenção de soro sanguíneo. As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo, e posteriormente levadas ao Laboratório de Sanidade Avícola e Multiuso (LASAVE) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e armazenadas a -20°C para posterior extração do DNA.

3.3.1. Questionário epidemiológico

Foi realizado um questionário epidemiológico semiestruturado na entrevista com o tutor. Neste questionário foram avaliadas as seguintes variáveis ambientais de forma dicotômica: número de cães na casa (1 ou mais de um), acesso do animal a rua (sim ou não), acesso a áreas de pasto (sim ou não), acesso à região de matas (sim ou não), presença de jardim no quintal (sim ou não), estação do ano no momento da coleta (primavera, outono, verão, inverno), período (chuvisco ou seco), regiões (Regiões de Baixa altitude ou Serrana), temperatura no momento da coleta (até 25°C, maior que 25°C), zona (zona rural ou urbana), presença de animais silvestres nas proximidades (sim ou não), presença de outros animais domésticos na casa (sim ou não), presença de córregos nas proximidades (sim ou não) e as condições de limpeza do ambiente era assinalada a partir de observação do entrevistador (boa ou ruim).

Também foram avaliadas variáveis intrínsecas dos cães tais como: idade (até 5 anos e acima de 5 anos), sexo (fêmea ou macho), raça (com raça definida ou sem raça definida), faz controle de ectoparasitos (sim ou não) e a periodicidade e forma de uso, se o animal possui acompanhamento veterinário (sim ou não), estado clínico no dia (saudável ou com manifestação clínica de qualquer natureza), escore corporal (peso ideal, sobrepeso ou abaixo do peso), porte do animal (pequeno e médio porte, aqueles que pesam até 15 kg ou grande e gigantes, os que pesam 16 kg ou mais).

3.3.2. Avaliação clínica dos animais e coletas de ectoparasitos

No momento da coleta, avaliou-se o escore corporal pela tabela fornecida por Burkholder et al. (2000), no ANEXO I. Tamanho e consistência dos linfonodos, coloração das mucosas oral e ocular (hipocoradas, normocorada ou hipercorada), tempo de preenchimento capilar com

a pressão dos dedos do examinador na gengiva do animal e uma inspeção minuciosa da pele pela procura de lesões; verificação de presença de otites e dermatites e os parâmetros cardiológicos e respiratórios. Também foi avaliada a dentição do animal e se o animal se encontrava ativo, atento ou apático e pouco responsivo.

O animal também foi inspecionado com intuito de localizar carapatos. A catação do animal durava um período médio de 15 minutos, ocasionalmente com ajuda de um pente fino. Os carapatos encontrados foram removidos manualmente e o ambiente do animal também foi inspecionado por um período equivalente. Os carapatos encontrados foram acondicionados em tubos de ensaio de 13x10mm, os quais foram vedados com algodão hidrofóbico. Os ectoparasitos foram armazenados em estufas B.O.D e processados no dia seguinte a coleta.

3.3.3. Identificação morfológica do carapato

Para a identificação das espécies de carapatos adultos foi utilizada a chave dicotômica descrita na literatura por Barros-Battesti (2006). Ninfas de carapatos do gênero *Amblyomma* foram identificadas utilizando a chave de Martins (2011), enquanto as larvas foram identificadas em nível de gênero (BARROS-BATTESTI, 2006). Para uma melhor visualização dos espécimes e seus detalhes morfológicos, foi utilizada uma lupa estereoscópica Nikon® MODEL C-LEDS com capacidade máxima de aumento de 35 vezes.

3.4. Extração de DNA Total

O DNA total do sangue foi extraído utilizando o kit de extração de DNA (DNeasy Blood & Tissue kit QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram extraídas e o DNA separado em 3 alíquotas de 30 uL cada; as amostras foram acondicionadas em freezer com temperatura média -20°C para posterior utilização nas reações em cadeia de polimerase.

3.5. Quantificação do DNA Total

Todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 da ThermoFisher. Amostras com quantificações superiores à 100ng de DNA total foram diluídas para concentração de 100 ng com o tampão Tris-EDTA (TE) (DNeasy® Blood & Tissue da Qiagen).

3.6. Realização de PCR em Tempo Real (qPCR) para Detecção de *Ehrlichia canis*.

A detecção molecular de *E. canis* foi realizada pelo qPCR utilizando-se o par de *Primers* e sonda (Quadro 2) descritos por Baneth et al. (2009). Os *primers* amplificam um fragmento de 93 pares de base (pb) utilizando como alvo o gene 16S rRNA.

Quadro 2. Sequências de *primers* e sonda para detecção molecular de *Ehrlichia canis* por PCR em tempo real a partir de amostras de DNA extraído de sangue de cães.

Primers e Sonda	
Forward	F5' TATAGCCTCTGGCTATAGGAAATTGTTA '3
Reverse	R5' ACCATTCTAACGGCTATTCCGTACTA '3
Sonda	5'6-FAM-TGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGG- TAMRA-3'

Fonte: Baneth, 2009

As reações foram realizadas em volume final de 10 uL, contendo os seguintes reagentes: 1x de TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 0,5 uM de cada *primer*, 0,2 uM da sonda e aproximadamente 200ng de DNA. As condições de termociclagem foram as seguintes: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 2 segundos e 60 °C por 20 segundos. Foram consideradas positivas as amostras com valor de Cq igual ou inferior a 40 ciclos.

3.7. PCR Convencional para amplificação da sequência 16S rRNA de *Ehrlichia canis* e sequenciamento

Com intuito de fazer uma análise filogenética do gene 16S das amostras positivas para *E. canis*, foram realizadas duas reações de PCR para a amplificação completa do gene 16S. As reações foram descritas por Unver et al. (2001) nas quais são usados dois pares de *primers* de 866pb (reação 1) e de 691pb (reação 2), respectivamente (Quadro 3). Ambas as reações foram executadas em 16 amostras com Cq menores que 33, obtidos na reação de qPCR, previamente descrita. Os Cqs maiores foram excluídos devido à dificuldade de gerar produtos de PCR em concentração suficiente para o sequenciamento.

Quadro 3. Sequência dos *primers* para amplificação da sequência completa do 16S rRNA de *Ehrlichia canis* descritos por Unver et al. (2001).

Primers (Forward e Reverse)	Número de Pares de base	Reação
A17-5'GTTTGATCCTGGCTCAG 3'(F) 817R – 5'-GAGTTTAGTCTTGCAC (R)	866	1
750F-5'TAGTCCACGCTGTAACG 3' (F) EC3-5'ACCCTAGTCACTAACCAAC3'(R)	691	2

As reações possuíam um volume final de 25ul contendo os seguintes reagentes e concentrações: 2,5 ml de DNA polimerase *buffer* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), Cloreto de Magnésio na concentração 2mM; 0,2mM de oligonucleotídeos; 0,4µM de cada *primer* e 1,5 Unidades da enzima Taq Polimerase e as condições de termociclagem foram as seguintes: 4 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 40 ciclos com 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 54°C e 60 segundos a 72°C após os 40 ciclos, 7 minutos a 72°C etapa de extensão final. Os produtos de PCR amplificados foram sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 2%. A eletroforese corre a 5V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio (0,4mg/ml) e observado sob luz ultravioleta usando L-PIX Touch System (Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). Os produtos de PCR foram purificados usando Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Em seguida, foram enviados para a Rede de plataformas tecnológicas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) na área de genômica situada no Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro.

3.8. Análise Espacial

Os mapas temáticos foram confeccionados a partir da base cartográfica do estado do Rio de Janeiro e suas municipalidades, disponível no banco de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017). Utilizou-se o formato de arquivo tipo – *shapefile* (SHP) na escala 1:25, mantendo as coordenadas previamente definidas pelo IBGE em graus decimais no Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas (SIRGAS, 2000).

As coordenadas geográficas coletadas com GPS de navegação, foram previamente organizadas em formatos de graus decimais. Em seguida, foi elaborada a tabulação dos dados relacionados aos cães, a tabulação das amostras que apresentavam resultado positivos para *E. canis* no qPCR; estas foram salvas em arquivos de formato CSV - *Comma Separated Value* para a construção da tabela.

A tabela CSV gerada, foi importada para o ambiente SIG, QGIS e salva como um arquivo vetorial de pontos no formato SHP. Todos os dados do município coletado foram incorporados no formato de georreferenciamento, zona Universal Transversa de Mercator (UTM) 23 Sul e os mapas foram reprojetados para SIRGAS 2000/UTM zona 23 S. Utilizando o arquivo com os pontos de coleta elaborados na etapa anterior, criou-se um mapa de densidade utilizando o estimador de densidade de Kernel contido na ferramenta interpolação - Mapa de calor do QGIS. Neste mapa, respeitando um gradiente de cores, estabeleceram-se 4 classes com intervalos iguais referentes ao número de casos positivos distribuídos no mapa.

3.9. Análises Estatísticas

Os dados obtidos nas entrevistas, do exame clínico e das análises laboratoriais foram colocados em plataforma digital e submetidos a testes estatísticos para análise dos dados. Os testes de Qui-quadrado e o exato de Fisher foram realizados para avaliar a associação entre a positividade de *E. canis* nas amostras e as variáveis obtidas pelo questionário epidemiológico (em nível dicotômico qualitativo 0 = negativo, 1= positivo).

Para avaliar diretamente os aspectos relacionados às diferentes altitudes, após a realização da análise descritiva dos dados das amostras, essas foram separadas em dois grupos. Um correspondente aos municípios localizados em regiões de baixa altitude (Barra do Piraí e Paracambi) e outro com municípios localizadas em regiões de altitude elevada (Petrópolis e Teresópolis). O teste de Qui-quadrado e o modelo de regressão logística foram novamente aplicados. Os valores foram considerados significativos estatisticamente quando o p-valor foi >0.05 .

Um modelo de regressão logística binária foi construído para explicar os possíveis fatores de risco associados com a presença de *E. canis* nas amostras de sangue de cães. As variáveis significativas nos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher admitindo-se um valor de p inferior a 0,25 (p-valor) foram analisadas pelo método de regressão logística múltipla. As variáveis incluídas no modelo foram submetidas ao método de Wald que testa a significância da inclusão das variáveis em cada estágio usando 0,1 como ponto de corte. As variáveis incluídas na análise multivariada foram analisadas para verificar multicolinearidade de acordo com Jesse e Menard (1996), assumindo o valor de tolerância $>0,1$ e Fator de Inflação de Variância (FIV) <10 . Entre as variáveis altamente correlacionadas aquela de maior plausibilidade biológica foi mantida na análise de regressão logística múltipla. A precisão do modelo de regressão final foi estabelecida pelo teste de Hosmer-Lemeshow (p-valor $> 0,05$).

As variáveis significativas nos testes de qui-quadrado ou exato de Fisher admitindo-se um p valor inferior a 0,25 (p-valor) foram analisadas e entre as variáveis altamente correlacionadas foram mantidas aquelas com maior FIV para a análise de regressão logística múltipla. A precisão do modelo de regressão final também foi estabelecida pelo teste de Hosmer-Lemeshow (p-valor $>0,05$).

3.10. Análise filogenética

A identidade das sequências 16S rRNA de *E. canis* foi avaliada por uma busca inicial com a ferramenta nBLAST, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A distância evolutiva foi calculada usando o modelo de Kimura-2-parâmetros com uma taxa de variação

entre os sítios modelada por uma distribuição gama. A distância evolutiva foi calculada utilizando o software MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Para análise filogenética foi construído um banco de dados composto por 68 sequências da porção 16S do DNA ribossomal de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp. disponíveis no GENBANK. O alinhamento das sequências foi realizado com o algoritmo CLUSTAL W disponível no software MEGA X (KUMAR et al., 2018). A reconstrução filogenética foi estimada através do método de Máxima verossimilhança. A seleção do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi realizada pelo software ModelTest v2.1.9 (POSADA; CRANDALL, 1998). A distância entre pares foi calculada com o modelo de substituição de Kimura-2-parâmetros + G (TAMURA et al., 2013). Para a análise de confiança dos grupos, foi utilizado o teste de “Bootstrap” com 1000 pseudoréplicas. A análise filogenética foi realizada no software MEGA X (KUMAR et al., 2018).

4. RESULTADOS

Foram coletadas 456 amostras de sangue de cães nas zonas rurais e urbanas de quatro municípios do estado do Rio de Janeiro ao longo do período de novembro de 2018 até outubro de 2019 (Figura 5). Foi observada uma frequência global de 22,59% ($n = 103/456$) de cães positivos para *E. canis* através da qPCR. (Tabela 1).

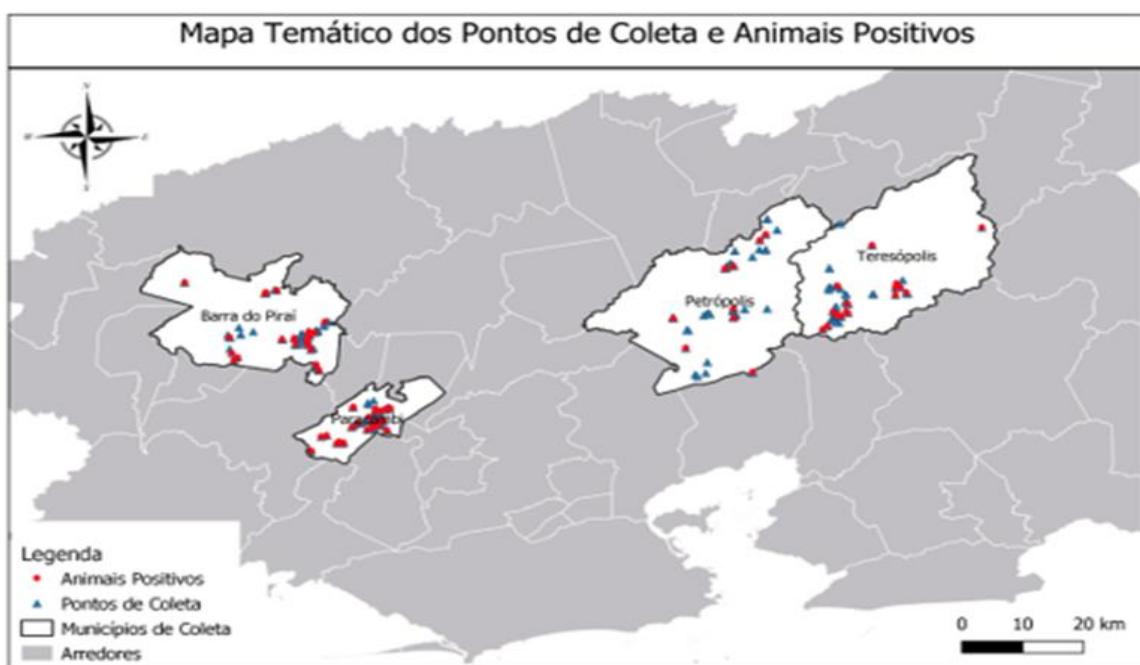


Figura 5. Mapa de pontos de coleta e animais positivos nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí (baixa altitude), Petrópolis e Teresópolis (elevada altitude) no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

No Município de Barra do Piraí, foram coletadas 127 ($n = 127/456$) das amostras; destas, 63 pertenciam à zona rural e 64 amostras pertenciam à zona urbana representando 27,8% das amostras coletadas. Foi observada uma frequência de 26,8% ($n = 34/127$) de cães positivos para *E. canis* nas amostras coletadas. Não houve diferença estatística entre as frequências obtidas na zona rural e urbanas deste município.

No Município de Paracambi, foram coletadas 122 amostras representando 26,7% do total das amostras (122/456); dessas, 59 (48,4%) pertenciam a áreas da zona Rural e 63 (51,6%) amostras pertencentes à zona urbana. Em todo o município foi observada uma frequência de 31,1% ($n = 38/122$) de cães positivos para *E. canis* através da reação de qPCR. Uma frequência de 35,59% ($n = 21/59$) de cães positivos para *E. canis* foi observado na zonal rural e 27% ($n = 17/63$) na zona urbana.

No município de Petrópolis, das 103 amostras coletadas (22,6%), 65 (63,1%) pertenciam a zona urbana e 38 (36,9%) pertenciam a zona Rural. A frequência de casos positivos foi de

9,7% (10/103) das amostras coletadas. Na zonal rural deste município foi observada uma frequência de 7,9% ($n = 3/38$) e na zona urbana 10,8% ($n = 7/65$).

E por fim, no município de Teresópolis, foram coletadas 104 (22,8%) amostras no total, sendo que, destas, 52 (50,0%) amostras pertenciam à zona urbana e 52 (50,0%) pertenciam à zona rural. A frequência de casos positivos encontrada neste município foi de 20,19%. Na zonal rural deste município foi observada uma frequência de 19,2% ($n = 10/52$) e na zona urbana 21,15% ($n = 11/52$). As frequências podem ser observadas na tabela 1. A distribuição de positivos da amostra pode ser observada no mapa de calor Kernel (Figura 6), neste mapa pode observar a distribuição dos casos positivos por área de concentração.



Figura 6. Mapa de densidade Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene 16S rDNA de *Ehrlichia canis* em região de baixada, médio Vale do Paraíba e Região Serrana do estado do Rio de Janeiro, período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Tabela 1. Positividade global e frequência segundo o município de infecção por *Ehrlichia canis* em cães através da PCR em tempo real nos municípios de Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis, RJ, Brasil.

Municípios	nº de amostras	Positividade global	Frequência relativa
Todos	456	22,59% (103/456)	-
Barra do Piraí	127	-	33,0% (34/103)
Paracambi	122	-	36,9% (38/103)
Petrópolis	103	-	9,7% (10/103)
Teresópolis	104	-	20,4% (21/103)

As coletas foram realizadas por um período de um ano, os resultados positivos (103 amostras) foram distribuídos ao longo do período de um ano, sendo o período de junho do ano

de 2019, o período com maior número de amostras positivas (16/103) ou uma frequência de 15,53% e os meses de maio (5/103), julho (6/103) e dezembro (3/103) os meses com menor frequência de positivos apresentando uma frequência de 4,8%, 5,8% e 2,91%, respectivamente (Figura 7).

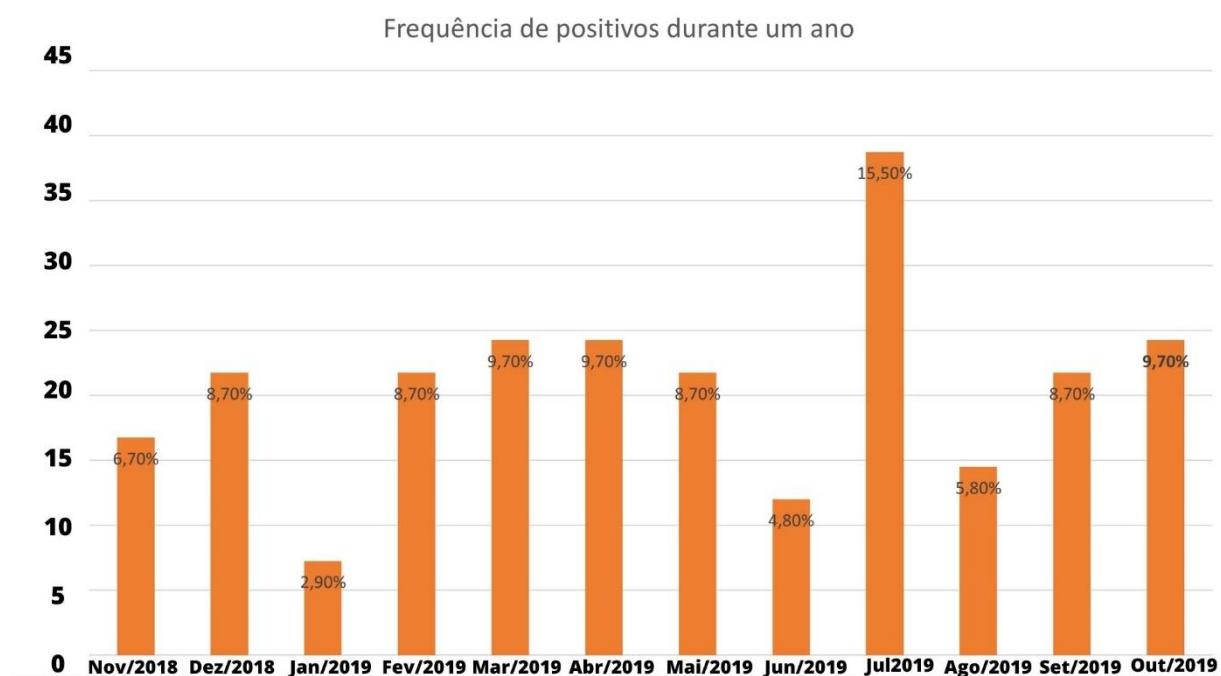


Figura 7. Frequência de cães positivos para *Ehrlichia canis* através da PCR em tempo real, segundo o mês de coleta no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Do período de novembro de 2018 a outubro de 2019 foram visitadas 456 domicílios. Em 84 residências foram encontrados caracatos, totalizando 412 espécimes, sendo 8 larvas, 109 ninfas e 295 adultos. Foram identificadas como *R. sanguineus* s.l 8 larvas, 92 ninfas e 290 caracatos adultos. Já 17 ninfas e 5 adultos foram identificados como pertencentes ao gênero *Amblyomma* spp. Através da divisão do N amostral, por municípios, registrou-se no município de Barra do Piraí 109 *R. sanguineus* adultos; no município de Paracambi obteve-se 60 ninfas e 64 indivíduos adultos; no município de Petrópolis foram coletados 19 fêmeas e 19 ninfas de *R. sanguineus* e 2 espécimes de *Amblyomma* spp e no município de Teresópolis encontrou-se 98 *R. sanguineus* adultos (Figura 8).

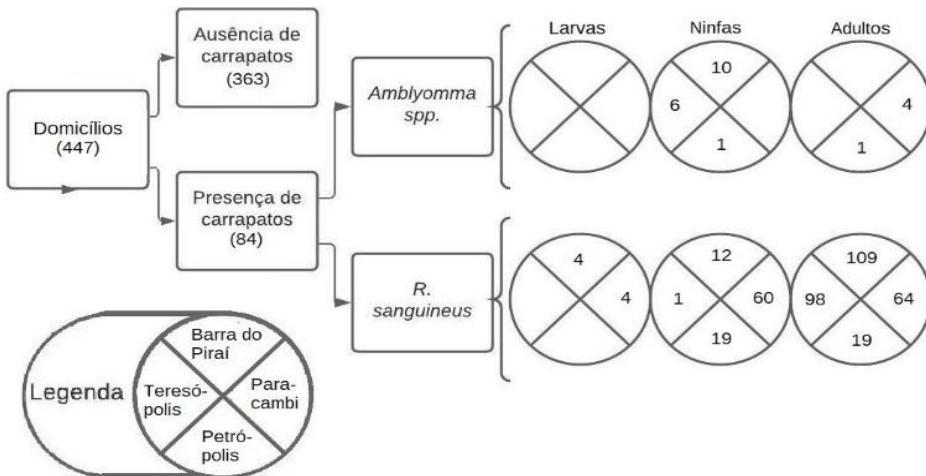


Figura 8. Organograma dos espécimes de carrapatos coletados separados por estágio, espécie e município. Fonte: Paulis, 2020.

4.1. Achados Epidemiológicos

Os resultados das análises bivariadas foram divididos em 4 tabelas: as variáveis ambientais biogeográficas (tabela 2), variáveis ambientais (tabela 3), variáveis comportamentais (tabela 4) e variáveis intrínsecas ao cão (tabela 5).

A análise bivariada demonstrou que as variáveis de baixa altitude (p -valor = 0,001). As residências com mais de um cão (p -valor 0,045), a presença de carrapatos (p -valor = 0,028), a presença de carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l (p -valor = 0,005), acesso a matas (p -valor = 0,004), acesso a pasto (p -valor = 0,005), acesso à rua (p -valor = 0,032) apresentaram associação com a presença do DNA de *E. canis* nas amostras de sangue de cães.

A análise bivariada dos fatores intrínsecos ao cão demonstrou que a variável raça (com raça definida ou sem raça definida) apresentou associação com a presença de DNA de *E. canis* nas amostras de cães ($OR = 1,85$; p valor = 0,016; IC: 1,11-3,07). O risco de infecção por *E. canis* é maior 1,85 vezes em cães com raça definida quando comparados com cães que não possuem uma raça definida. As raças amostradas neste estudo foram American bully, Basset hound, Beagle, Blue heeler, Bulldog americano, Bulldog francês, Bull terrier, Chow-chow, Cocker Spaniel, Dachshund, Fox paulistinha, Golden, Labrador, Lhasa Apso, Maltês, Pastor alemão, Pinscher, Pitbull, Poodle, Pug, Red heeler, Rottweiler, Salmoieda, São Bernardo, Shih-Tzu, Spitz, Terranova e Yorkshire.

Demais variáveis extrínsecas como zona (rural e urbana), estação do ano, período do ano, temperatura, presença de outras espécies domésticas no domicílio, presença de animais silvestres nos arredores, presença de vegetação em casa, limpeza do ambiente, se o animal possui abrigo, e intrínsecas como escore corporal, porte (grande ou gigante, pequeno ou médio),

castrado, comprimento dos fios longo ou curto), se o animal possui assistência veterinária , idade (até 5 anos e acima de 5 anos), se animal faz controle de ectoparasitos, estado clínico no dia (saudável ou apresentam sinal sintoma clínico). Não foi observada associação significativa entre os fatores relacionados ao animal e a presença do DNA do patógeno em suas respectivas amostras

Tabela 2. Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis biogeográficas na presença de DNA de *Ehrlichia canis* nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Variáveis	Análise Descritiva			Análise Bivariada		
	Nº amostras	Número positivos	de Frequência Relativa (%)	X ²	P valor**	OR (IC 95%)
Altitude	456			12,56	0	2,31 (1,44-3,70)
Região Serrana (acima de 600 metros)	207	31	15,0			
Região de Baixada (abaixo de 600 metros) *	249	72	28,9			
Zona urbana x Zona rural	456			0,85	0,36	0,81 (0,52 - 1,26)
Urbana*	244	51	20,9			
Rural	212	52	24,5			
Período chuvoso x Seco	456			0,2	0,66	1,11 (0,70 - 1,74)
Chuvoso *	173	41	23,7			
Seco	283	62	21,9			
Temperatura	456			0,21	0,65	1,11 (0,71 - 1,74)
1°C até 25°C*	270	63	23,3			
Maior que 26°C	186	40	21,5			

Tabela 3. Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis ambientais na presença de DNA de *Ehrlichia canis* nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Variáveis	Análise Descritiva			Análise Bivariada		
	Nº amostras	Número positivos	Frequência Relativa (%)	X ²	P valor**	OR (IC 95%)
Presença de carrapato	456			4,83	0,03	1,71 (1,06-2,77)
Sim*	113	34	30,1			
Não	343	69	20,1			
Presença de carrapato espécie <i>Rhipicephalus sanguineos s.l</i>	456			7,87	0,01	2,19 (1,26-3,82)
<i>Rhipicephalus sanguineos s.l</i> *	67	24	35,8			
Outro ou nada	389	79	20,3			
Número de cães compartilhando o domicílio	456			4,02	0,04	1,60 (1,01-2,55)
Apenas 1 cão	271	70	25,8			
Dois ou mais*	185	33	17,8			
Presença de outras espécies domésticas	456			0,05	0,81	0,95(0,60 - 1,48)
Sim*	257	57	22,2			
Não	199	46	23,1			
Presença de animais silvestres	456			0,06	0,8	1,08(0,60 - 1,94)
Sim*	377	86	22,8			
Não	79	17	21,5			
Presença de vegetação no quintal	456			1,59	0,21	1,38(0,84 - 2,26)
Sim*	318	77	24,2			
Não	138	26	18,8			
Condições de higiene do ambiente	456			1,97	0,16	0,70 (0,44 - 1,15)
Ruim*	150	28	18,7			
Boa	306	75	24,5			
Cão Possui abrigo	456			0,006	0,94	1,02 (0,65 - 1,60)
Não*	180	41	22,8			
Sim	276	62	22,5			

Tabela 4. Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis comportamentais na presença de DNA de *Ehrlichia canis* nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Variáveis	Análise Descritiva			Análise Bivariada		
	Nº de amostras	Número de positivos	Frequência Relativa (%)	X ²	P valor**	OR (IC 95%)
Cão tem acesso ao pasto	456				8,07	0,01
Sim*	159	48	30,2			1,90 (1,22-2,98)
Não	297	55	18,5			
Cão tem acesso a rua	456			4,62	0,03	1,62 (1,04-2,52)
Sim*	197	54	27,4			
Não	259	49	18,9			
Cão tem acesso a mata	456			8,13	0	1,90 (1,22-2,95)
Sim*	188	55	29,3			
Não	268	48	17,9			
Cão tem acesso a córregos	456			2,47	0,12	1,44 (0,91 - 2,27)
Sim *	148	40	27,0			
Não	308	63	20,5			

Tabela 5. Análise estatística descritiva e bivariada das variáveis intrínsecas na presença de DNA *Ehrlichia canis* nas amostras coletadas no período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Variáveis	Análise Descritiva			Análise Bivariada		
	Nº amostras	de Número positivos	de Frequência Relativa (%)	X ²	P valor**	OR (IC 95%)
Raça	456				5,79	0,016
Com raça definida	305	79	25,9			1,85 (1,12 - 3,07)
Sem raça definida	151	24	15,9			
Pelo	456			5,77	0,016	0,57 (0,36-0,90)
Longo	193	33	17,1			
Curto	263	70	26,6			
Escore corporal	456			2,33	0,127	1,49 (0,89 - 2,52)
Abaixo do Peso	91	26	28,6			
Normal ou Sobre peso	365	77	21,1			
Porte	456			0,50	0,479	1,18 (0,74 - 1,89)
Pequeno e médio (até 15kg)	314	68	21,7			
Grandes e Gigantes (acima de 16 kg)	142	35	24,6			
Castrado	456			2,82	0,093	0,66 (0,40 - 1,07)
Não	343	71	20,7			
Sim	113	32	28,3			
Possui assistência veterinária	456			0,62	0,433	1,19 (0,77 - 1,85)
Não	228	55	24,1			
Sim	228	48	21,1			
Sexo	456			0,96	0,328	1,25 (0,80 - 1,94)
Macho	233	57	24,5			
Fêmea	223	46	20,6			
Idade	456			2,43	0,119	0,70 (0,45 - 1,10)
Mais de 6 anos	278	56	20,1			
Até 5 anos	178	47	26,4			
Teve doença do carrapato	456			0,37	0,541	0,71 (0,24 - 2,14)
Não	433	99	22,9			
Sim	23	4	17,4			
Faz controle de ectoparasitas	456			1,14	0,287	1,28 (0,82 - 2,00)
Não	286	60	21,0			
Sim	170	43	25,3			
Saúde ao exame clínico	456			2,30	0,129	1,44 (0,90 - 2,31)
Saudável	328	68	20,7			
Algum sintoma	128	35	27,3			

As variáveis acesso à rua, altitude, raça e presença de *R. sanguineus* s.l. no animal e/ou no ambiente em que habita foram selecionadas para o modelo de regressão logística após a avaliação de variáveis altamente correlacionadas e a exclusão das variáveis correlacionadas selecionadas como biologicamente menos relevantes em comparação a outra. O modelo de análise multivariada apresentou as variáveis: Raça (OR:1,87; p-valor 0,018; IC:1,11-3,14), acesso à rua (OR: 1,77; p-valor: 0,014; IC:1,12-2,80), Altitude (OR:2,18; p-valor=0,002; IC:1,35-3,54); Presença de *R. sanguineus* (OR:1,87, p-valor: 0,034, IC:1,05-3,33) significativamente associados à presença de DNA de *E. canis* nas amostras. (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de regressão logística das variáveis associadas com cães positivos para *Ehrlichia canis* através da reação de PCR em tempo real nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí (baixa altitude), Petrópolis e Teresópolis (alta altitude) no estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de novembro de 2018 até outubro de 2019.

Número de animais: 456						
Variáveis	Categorias	β	Erro (β)	Wald	P valor **	OR (IC 95%)
Raça	SRD*	0,63	0,27	5,55	0,018	1,87 (1,11-3,14)
	CRD*		0,23			
Cão com acesso à Rua	Sim	0,57		6,04	0,014	1,77 (1,12-2,80)
	Não					
Altitude	Abaixo de 600metros	0,78	0,25	10,04	0,002	2,18 (1,35-3,54)
	Acima de 600metros					
Presença de <i>Rhipicephalus</i> <i>sanguineos</i> s.l	Sim	0,63	0,30	4,49	0,034	1,87 (1,05-3,33)
	Outro ou nenhum					
Constant						
-2,52 0,31 64,87 0,000 0,08						

Variáveis dependentes: animais positivos, resultados em β : beta; Erro; OR: razão de chances; (95% IC): Intervalo de confiança com $p^{**} < 0,05$. * SRD – Sem Raça Definida, CRD – Com Raça Definida

Em seguida, após o teste de Wald foi realizada a prova de Hosmer-Lemeshow no qual foi obtido um p-valor de 0,921 com a finalidade de testar a força que as variáveis causais inclusas no modelo explicam a ocorrência de *E. canis* em cães nas condições do estudo. Quando p-valor for maior que 0,05, significa que o modelo de regressão logística serve para explicar os casos positivos do estudo. Ao fim do teste, o modelo com as quatro variáveis citadas explica 73% dos casos de infecção por *E. canis* neste estudo realizado.

Com o objetivo de isolar o efeito da altitude sobre a epidemiologia de *E. canis*, foi realizada uma nova análise estatística das variáveis em cada gradiente de altitude (região até 600m de altitude e regiões de mais de 600metros de altitude) separadamente. Para os cães domiciliados na região de menor altitude (Paracambi e Barra do Piraí) as variáveis ambientais que obtiveram associação com a presença de DNA de *E. canis* nesse grupo foram: presença de *R. sanguineus* s.l (OR=2,08; p-valor=0,025; IC= 1,09-3,97), acesso a pasto (OR=1,84, p-valor=0,035; IC=1,06-3,19), acesso à mata (OR=2,02, p-valor=0,012; IC=1,16-3,50) e a presença de carapatos (OR=1,81, p-valor=0,043; IC=1,01-3,21). A variável intrínseca que tive associação nesse grupo foi: animal castrado (OR=0,38, p-valor=0,004; IC=0,20-0,75).

Para o grupo de cães domiciliados nos municípios com elevada altitude (Petrópolis e Teresópolis), a variável extrínseca que foi associada à presença de DNA de *E. canis* foi o acesso a rua (OR=1,45, p-valor=0,048; IC=0,84-2,50). Com relação às variáveis intrínsecas apenas cães sem raça definida apresentou associação com *E. canis* (OR=1,81, p-valor=1,705; IC=0,91-3,19).

As variáveis que apresentaram significância foram submetidas aos testes para a realização de modelos de regressão em cada região (baixada e serrana). O grupo de variáveis para os cães domiciliados na Região Serrana apresentou alta colinearidade e, portanto, não foi possível a realização de um modelo. Já no grupo dos cães domiciliados em baixas altitudes, as únicas variáveis que não apresentaram colinearidade foram animais não castrados (OR=2,7, p- valor: 0,004, IC=1,38-5,41) e os de acesso à mata OR=0,739, P-valor: 0,010, IC=1,193-3,675) explicando 71,5 % dos casos.

4.2. Análise filogenética

A identidade das sequências 16S rRNA de *E. canis* obtidos no presente estudo (n=16) variou de 98,74 a 100% quando comparada com outros isolados disponíveis no Genbank. A amostra 464 apresentou um percentual de identidade que variou de 91,04 a 91,86% com isolados de *Ehrlichia* spp. disponíveis no Genbank. No presente estudo foi observado uma maior heterogeneidade das sequências 16S rRNA de *E. canis* entre as amostras obtidas de cães domiciliados no município de Teresópolis (exceto a amostra 464), com uma distância evolutiva de 0.0037.

No município de Paracambi, as sequências 16S rRNA de *E. canis* foram mais homogêneas, com uma distância evolutiva de 0,0011. A distância evolutiva entre as sequências 16S de *E. canis* obtidos de cães do município de Barra do Piraí foi de 0,0017. Quando a distância evolutiva foi comparada entre as sequências de diferentes municípios, uma maior divergência

genética foi observada entre os municípios de Barra do Piraí e Teresópolis, com uma distância de 0,00264. A distância evolutiva calculada entre os demais municípios pode ser consultada na Tabela 6 e a distância evolutiva entre todas as sequências 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. variou de 0,0 a 0,0992, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Distância evolutiva média (distância-p) entre as sequências de 16SrRNA de *Ehrlichia canis*, obtidas de cães naturalmente infectados, dos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Teresópolis e Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

	Paracambi-RJ	Barra do Piraí-RJ	Teresópolis-RJ
Paracambi-RJ			
Barra do Piraí-RJ	0,00135		
Teresópolis-RJ	0,00230	0,00264	
<i>Ehrlichia</i> sp.- Teresópolis-RJ	0,09390	0,09436	0,09467

Na análise filogenética, as sequências 16S rRNA de *E. canis* obtidas nesse estudo agruparam-se em um único bloco junto com as outras sequências de *E. canis* de diversas partes do mundo. A amostra 464 agrupou-se entre os clados de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., entretanto, está filogeneticamente mais relacionada com as espécies do gênero *Ehrlichia* (Tabela 8). Porém, através da análise filogenética a amostra 465 pode ser classificada apenas dentro do gênero *Ehrlichia*, não sendo possível a classificação em nível de espécie (Figura 9).

Tabela 8. Matrix de distância evolutiva (distância-p) par-a-par entre as sequências de 16SrRNA de *Ehrlichia canis*, obtidas de cães naturalmente infectados nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Teresópolis e Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

	68	78	127	264	314	276	366	188	289	300	324	360	386	370	438	458
Amostra 68 - Paracambi-RJ																
Amostra 78 - Barra do Piraí-RJ	0,0000															
Amostra 127 - Barra do Piraí-RJ	0,0000	0,0000														
Amostra 264 - Paracambi-RJ	0,0000	0,0000	0,0000													
Amostra 314 - Barra do Piraí-RJ	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000												
Amostra 276 - Barra do Piraí-RJ	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000											
Amostra 366 - Teresópolis-RJ	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000										
Amostra 188 - Paracambi-RJ	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007									
Amostra 288 - Barra do Piraí-RJ	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0000								
Amostra 300 - Teresópolis-RJ	0,0049	0,0049	0,0049	0,0049	0,0049	0,0049	0,0049	0,0056	0,0056							
Amostra 324 - Paracambi-RJ	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0014	0,0014	0,0014	0,0056						
Amostra 360 - Teresópolis-RJ	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000	0,0006	0,0014	0,0056					
Amostra 386 - Paracambi-RJ	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000	0,0006	0,0014	0,0000	0,0056				
Amostra 370 - Barra do Piraí-RJ	0,0042	0,0042	0,0042	0,0042	0,0042	0,0042	0,0049	0,0049	0,0092	0,0049	0,0049	0,0049				
Amostra 438 - Barra do Piraí-RJ	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0007	0,0063	0,0021	0,0007	0,0007	0,0056			
Amostra 458 - Paracambi-RJ	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014	0,0021	0,0021	0,0063	0,0021	0,0021	0,0021	0,0056	0,0028		
Amostra 484 - Teresópolis-RJ	0,0934	0,0934	0,0934	0,0934	0,0934	0,0934	0,0945	0,0945	0,0971	0,0943	0,0945	0,0962	0,0954	0,0953		

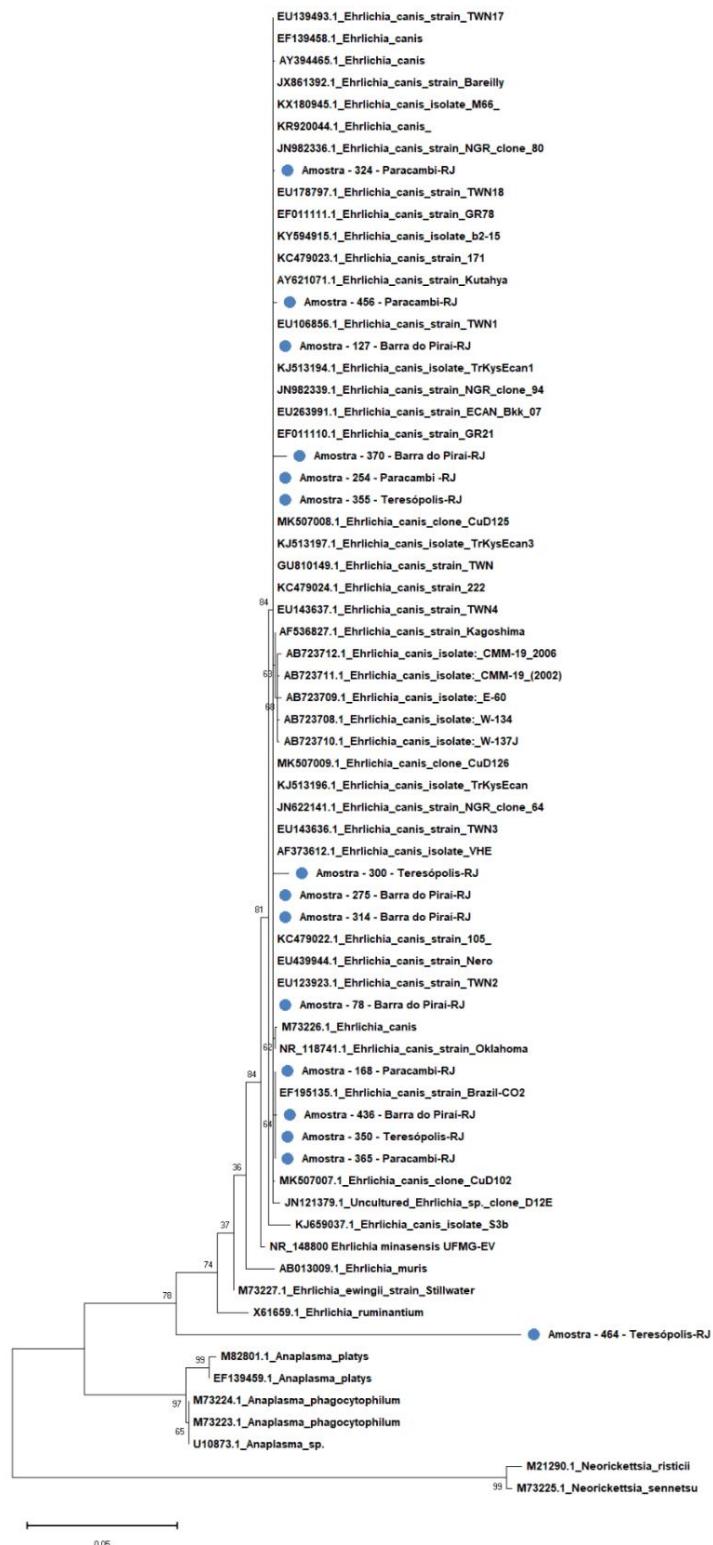


Figura 9. Árvore filogenética inferida pelo método de Maximum Likelihood a partir de sequências 16S rRNA de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp.

A análise filogenética foi inferida usando o método de Maximum Likelihood a partir de sequências 16S rRNA de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi Kimura-2-parâmetros.

Os números nas ramificações indicam o valor do Bootstrap em 1000 réplicas. A análise envolveu 68 sequências de nucleotídeos e havia um total de 1287 posições no dataset final. As análises evolucionárias foram realizadas no Mega X (KUMAR et al., 2018).

5. DISCUSSÃO

A EMC é uma das principais doenças que acometem cães no Brasil e no Mundo. A elaboração de estudos epidemiológicos permite compreender melhor as situações que podem influenciar a difusão desta bactéria, que é transmitida por carapatos. A EMC faz parte da rotina da clínica veterinária de cães e seu agente etiológico tem potencial zoonótico, o que torna importante sua compreensão para medidas de saúde pública.

Ao realizar a análise descritiva desse estudo, foi encontrada uma frequência de 22,6 % de resultados positivos para a presença de DNA de *E. canis* nas amostras coletadas nos quatro municípios do estado do Rio de Janeiro. Um estudo semelhante, que também utilizou detecção molecular, realizado por Paulino et al. (2018) em outros municípios do interior do estado do Rio de Janeiro, apresentou uma frequência semelhante (24,8%) apesar de não se encontrar em locais próximos da maioria dos municípios estudados neste experimento.

O presente estudo e o de Paulino et al. (2018) foram realizados com animais aparentemente saudáveis ao exame clínico, isto é, com ausência de sinais clínicos comuns a EMC. Isso sugere que os animais pesquisados apresentavam uma infecção subclínica e, portanto, uma quantidade reduzida de DNA da bactéria disponível no sangue do animal que pode gerar resultados falsos negativos, resultando, então, em uma frequência real de infecção por *Ehrlichia canis*, nos animais da amostra, podendo ser maior do que as frequências encontradas nesses estudos.

Uma alternativa para diminuir as chances de falsos negativos seria a coleta de material de outros órgãos como baço, medula óssea e fígado. (WARNER et al., 2014; PAULINO et al., 2018). No entanto, a metodologia é bastante invasiva e limitada, pois precisaria do acesso desses animais a um ambulatório veterinário para a coleta dessas amostras.

Uma outra solução para determinar com maior precisão a prevalência desse parasita, seria ampliar o modelo experimental adicionando outras metodologias de diagnóstico, por exemplo, testes sorológicos, como o ELISA, através da microscopia ótica com esfregaços sanguíneos de ponta de orelha e lançando mão de critérios de amostragem probabilísticos e representativos da população sob risco. É importante ressaltar que todas essas técnicas possuem suas próprias limitações, mas utilizar mais de uma metodologia pode ser uma alternativa para aumentar a precisão da análise descritiva.

Os municípios que obtiveram a maior frequência de positivos, Paracambi e Barra do Piraí, respectivamente, encontram-se em territórios de altitude baixa a moderada (OR: 2,309; p-valor: 0,00IC:1,44-3,70). Esta variável está associada à frequência de positivos neste estudo apresentando um risco 2,3 vezes maior, quando comparada a regiões de altitudes mais elevadas.

A caracterização da altitude, portanto, pode exercer um papel importante na epidemiologia do agente.

É possível que a variação de altitude entre cada município cause interferência diretamente no clima, principalmente no que se diz respeito à umidade. Regiões montanhosas, como é o caso de Petrópolis e Teresópolis, têm maior dificuldade na dispersão da umidade, isto é, que ela consiga passar livremente para outros lugares, o que torna o clima significativamente mais úmido e com uma sensação térmica menor do que regiões como vales e baixadas, como é o caso de Barra do Piraí e Paracambi, por exemplo, pois as nuvens carregadas de umidade podem transitar livremente sem a barreira rochosa e se dispersar para outros lugares. Apesar da variável de temperatura no momento que ocorreu a coleta não apresentar significância estatística, ela não é o único fator que é capaz de interferir no clima da região.

Um estudo elaborado por Cronenberger et.al. (2011), objetivou caracterizar os microclimas inerentes ao estado do Rio de Janeiro. Segundo o estudo, os municípios de Barra do Piraí e Paracambi caracterizam-se pelo clima mesotérmico, ou seja, estação quente e chuvosa no verão e estação seca no inverno. Dá-se a esse tipo de clima, o nome de Cwa de acordo com a classificação de Köpen. Já a região Serrana, nome que se dá à região da Serra dos Órgãos (Petrópolis e Teresópolis), caracteriza-se como uma região de elevadas altitudes e de caráter montanhoso e por isso permanece com um clima úmido e chuvoso ao longo de todo o ano. Dá-se, a esse tipo de clima, o nome de Cfb pela classificação de Köpen, o que caracteriza um clima de verões brandos e sem estação seca.

A umidade presente nos municípios de altitude pode ser responsável por uma redução no número de vetores de *E. canis* nestes locais, o que por sua vez pode reduzir as chances de infecção do cão pelo agente, uma vez que, menos vetores estão viáveis. Sabe-se que o clima de um lugar influencia diretamente no comportamento e na frequência do vetor (RANDOLPH, 2004; DANTAS-TORRES et al., 2015).

Quando o parasita se depara com temperaturas mais amenas ou ambientes que se encontram em situações mais chuvosas, sua postura de ovos cai, assim como a eclosão dos mesmos, o número de carrapatos pode diminuir ao longo daquele ano ou lugar (LABRUNA; PEREIRA, 2001; COSTA JR et al., 2006). Um estudo realizado por Miglinore et al. (2020) realizado na região da Sicília, na Itália, encontrou-se uma quantidade significativa de casos positivos e infestações por carrapatos em regiões onde as chuvas não eram tão frequentes, e por conta disso, o número de animais infestados por carrapatos foi maior. Dessa forma, esse achado

sustenta a hipótese de que durante o estudo, os municípios de alta altitude poderiam ter menos vetores e por isso menos infecções pelo agente.

Costa-Junior et al. (2007), encontraram no município de Nanuque, região mineira que fica ao nível do mar (168 metros aproximadamente), uma frequência maior de positivos quando comparada aos outros dois municípios que se encontram em altitudes maiores, Lavras (1060 metros) e Belo Horizonte (780 metros). Nanuque possui uma temperatura média considerada quente e possui, pelo menos, uma estação seca ao longo do ano. Tal qual é o caso do município de Paracambi e do município de Barra do Piraí, com isso ajuda a sugerir que a variável altitude pode estar relacionada com uma maior frequência do agente.

Randolph (2004), afirma que não existem dúvidas sobre os fatores climáticos influenciarem a forma que as doenças transmitidas por vetores funcionam. No entanto, também afirma que o clima é multidirecional e não apenas unidirecional, ou seja, assim como algumas variações climáticas podem beneficiar a transmissão de patógenos, outras variações em um mesmo ambiente podem atrapalhar o desenvolvimento desses mesmos patógenos. Portanto, esse tipo de dado deve ser avaliado com cautela, porque, em alguns casos, esse antagonismo de características (variável benéfica *versus* variável inibidora) promovem uma regulação interna e não ocasionará uma prevalência maior de um agente patogênico. Com isso, deve-se observar com cuidado os dados epidemiológicos extrínsecos no que diz respeito a fatores ambientais. Variáveis não associadas ou fracamente associadas podem na verdade ter suas associações mascaradas por terem sido avaliadas por um período curto ou por terem outras variáveis inibidoras do desenvolvimento dentro daquele modelo.

A variável temperatura, período seco ou chuvoso não foram variáveis associadas à infecção por *E. canis* na região estudada. Apesar disso, deve-se levar em consideração que o período de estudo foi de apenas um ano, isso limita em boa parte uma análise mais acurada dessas variáveis, porque a flutuação pluviométrica no período de um ano é maior, inconstante e passível de influências climáticas isoladas. Estudos por períodos mais longos podem mudar a percepção desse resultado, porque a flutuação pluviométrica poderá diminuir e eventos isolados acabam sendo diluídos em função do tempo permitindo uma avaliação mais acurada da variável pluviosidade.

Ao relacionar a altitude e, por consequência, o microclima inerente a esse tipo de topografia como um fator associado à frequência do patógeno nos cães, não é possível deixar de relacioná-lo à frequência do vetor (carrapato) na ocasião da coleta e como esta variável se relaciona com a frequência de amostras positivas para o DNA do patógeno que é objeto deste estudo. Animais

que estavam parasitados por carapatos apresentavam 1,71 vezes mais chance de apresentarem *E. canis* em sua amostra de sangue (OR=1,71, p-valor=0,023, IC 1,06-2,77).

Paulino et al. (2018) e Azevedo et al. (2011) relataram um resultado parecido de associação entre o vetor (o carapato) e a frequência de cães positivos para *E. canis*. Também foi observado em ambos os trabalhos que o acesso do cão a ambientes não controlados, ou seja, ambientes onde não é possível controlar a exposição do cão ao patógeno, como o acesso a rua, acesso a matas, a pastos etc., como um fator de risco importante para a infecção por *E. canis* e isso acontece muito provavelmente porque aumenta-se as chances de exposição do cão ao vetor infectado pelo agente.

É sabido, através de inúmeras referências na literatura, que a exposição ao vetor é um dos mais importantes fatores de risco para a infecção por *E. canis*. Outros fatores importantes estão indiretamente relacionados à exposição do cão ao vetor transmissor como, por exemplo, o ambiente que o animal habita e regiões endêmicas para o vetor (AZEVEDO 2011; BEALL et al., 2012; MIRCEAN et al., 2012; DARAMOLA, 2017; PAULINO et al., 2018).

Animais constantemente e altamente infestados por carapatos apresentam mais chances de se infectar, possivelmente, por uma maior frequência de exposição ao vetor. Desta forma, quanto maior e mais frequente for a infestação, maiores as chances de um carapato infectado se fixar no hospedeiro e transmitir o patógeno.

Também é possível considerar que animais que estão parasitados pelo vetor no momento da coleta podem estar com uma bacteremia mais alta e, por consequência, é mais fácil detectar o DNA do agente patogênico nesses animais.

A presença da espécie do carapato, no caso, *R. sanguineus*, também apresentou associação estatística com a infecção em cães por *E. canis* (OR=2,19, p-valor =0,005, IC=1,26-3,82). Talvez a frequência maior de *R. sanguineus* quando comparada a outras espécies de carapato possa ser relacionada a sua ecologia adaptada a viver em espaços urbanos e ambientes domiciliados. Parte do seu ciclo se dá em rachaduras de paredes no interior de domicílios e no abrigo dos animais não necessariamente passando pela vegetação (LA BRUNA; PERERIA, 2001).

Daramola et al. (2018) na Nigéria e Paulino et al. (2018) no Brasil, também relatam que a frequência de cães positivos para *E. canis* estava associada à presença deste vetor. Na região de Yucatan no México, a elevada taxa de endemicidade da bactéria está relacionada, principalmente, as altas infestações por *R. sanguineus* s.l. (OJEDA-CHI et al., 2019).

Segundo Trapp et al. (2006) a presença de *R. sanguineus* é o principal fator de risco para o desenvolvimento de Erlichiose. No entanto, é importante considerar que para um animal ser infectado por *E. canis*, basta um único carrapato infectado. Portanto, apesar da frequência de carrapatos estar associada à presença do DNA de *E. canis*, dentro do ambiente da rotina clínica veterinária, mesmo que o animal não apresente carrapatos por ocasião do exame clínico, outras variáveis deverão ser consideradas para a triagem correta e posterior pesquisa para detecção de *E. canis* no animal (DANTAS- TORRES et al., 2018).

Trapp (2006) sugere que os principais fatores de risco relacionados à transmissão do patógeno são aqueles que aumentam as chances do animal ser infestado por carrapato. O número de cães em um mesmo ambiente, o acesso desses animais a ambientes não controlados como a rua, pastos e matas são fatores que favorecem a infestação por carrapatos.

Animais deste estudo que se encontravam em ambientes com mais de um cão ou em criações promíscuas com muitos cães, possuem 1,6 vezes mais chances de serem positivos para *E. canis* (OR: 1,6; p-valor: 0,045; IC: 1,01-2,55); uma hipótese para esta afirmação é que quando existem mais de um cão em um mesmo ambiente aumenta-se a probabilidade de, pelo menos, um se infestar com carrapatos e tornar-se positivo. Stich et al. (2014), Barrantes-Gonzales et al. (2016) e Perez Macchi et al. (2018) encontraram também essa associação. Também é válido sugerir que, quanto mais hospedeiros para o carrapato existirem, maior a disponibilidade de alimentos e maior a chance de se completar o ciclo, aumentar sua população e, consequentemente, a chance de infestar outros animais.

A ecologia do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* tem por base que a fêmea utiliza o hospedeiro apenas para se alimentar, enquanto o macho além de se alimentar, usa o hospedeiro para procurar fêmeas para copular podendo, inclusive, mudar de animal no intuito de copular com outras fêmeas (DANTAS-TORRES, 2010). Esse comportamento facilita a disseminação de *Ehrlichia canis* e ajuda a justificar porque mais de um cão em um mesmo ambiente pode ser um fator agravador do risco para a infecção pela bactéria.

Deve-se levar em consideração também que mais de um animal na casa aumenta os custos para o controle de ectoparasitos e foi observado, durante as entrevistas, que o custo dos produtos ou a falta de orientação quanto a forma mais correta de usar eram fatores impeditivos para o uso de ectoparasiticidas.

As variáveis “acesso à rua, “acesso a pasto” e “acesso a matas” que apresentaram associação com a infecção dos cães neste estudo, demonstraram conforme já foi especulado, que o aumento da exposição do animal a outros ambientes não controlados eleva o risco para

um resultado positivo para a infecção pelo patógeno. É muito provável que isso se dê, por aumentar as chances de exposição ao vetor, conforme descrito por Santos et al. (2013). O acesso a outros ambientes com características diferentes de higiene, vegetação e contactantes torna possível a infestação por carrapatos presentes nesses lugares e por isso, torna-se um fator de risco para a infecção pelo agente patogênico.

A variável acesso à rua, no modelo de regressão logística global das amostras, ajuda a justificar 73% dos casos encontrados juntamente com as variáveis raça, presença de *R. sanguineus* e por estarem localizados em baixas altitudes.

Quando foi realizado um novo modelo de regressão logística isolando a variável de baixa altitude, constatou-se que 71% dos casos positivos encontrados nas regiões de baixas altitudes podem ser explicáveis por essa variável (acesso à mata) associada ao fato dos animais não serem castrados ($OR=2,70$, p - valor: 0,004, $IC=1,38-5,41$). Animais não castrados tendem a ter um comportamento mais exploratório e territorialista e isso faz com que saiam mais vezes de casa em busca de cópula ou no intuito de espantar outros “cães invasores” em seu território gerando uma chance maior de exposição ao vetor.

Conforme dito anteriormente, o comportamento do macho *R. sanguineus* é mudar de hospedeiro em busca de mais fêmeas para a procriação. O contato próximo entre cães não castrados no momento da cópula ou de disputa de fêmeas, corrobora as chances de animais não castrados apresentarem mais resultados positivos.

Também é possível ressaltar que apesar da presença de espécies silvestres não apresentarem associação estatística neste estudo, animais com acesso à mata nos municípios da baixada podem ter mais chances de adquirir a doença ao se expor a animais silvestres como quatis e gambás durante seus passeios nas matas próximas. Até o momento, não foi encontrada infecção por *Ehrlichia canis* em carnívoros silvestres na região. No entanto, existem relatos de carnívoros silvestres na Europa como raposas, lobos e coiotes (MIRÓ et al., 2013; ANDRÉ, 2018) infectados por esse bioagente. Animais silvestres podem ser reservatórios de inúmeros agentes de doenças transmitidas por vetores. (ANDRÉ, 2018). Miró et al. (2013), justificam seus achados de uma prevalência maior de *Ehrlichia* spp. em animais ao norte da Espanha levantando a hipótese de que a presença de matas na região, juntamente com o contato próximo desses cães com canídeos silvestres no local seja a maior razão de ocorrência na área. Essa justificativa é cabível para os dados encontrados, porém, um trabalho maior, com uma coleta distribuída em mais municípios em situações e condições parecidas poderia trazer mais algumas respostas, assim como a avaliação hematológica e molecular de sangue da fauna

selvagem local. Esses achados contribuem para vincular a ideia de que o acesso do animal a outros ambientes aumenta as chances dele se infectar com o agente etiológico.

Cães com mais de 3 anos foram associados a uma maior frequência de *E. canis* em um estudo conduzido em Yucatan no México (OJEDA-CHI et al., 2019). Os autores Gonzales-Barrantes et al. (2016) e Vieira et al. (2013) também encontraram associação entre idade e a presença de DNA de *E. canis* em cães. É provável que animais nessas faixas etárias tenham mais oportunidades para a infecção através do contato com o vetor ou que o estado imunológico do animal seja mais debilitado. No entanto essa variável não se mostrou significativa neste estudo (*p*-valor <0,05). Paulino et al. (2018) e Silva et al. (2012) também não encontraram associações entre a idade e infecção por *E. canis*, talvez porque as faixas etárias estipuladas foram diferentes, o que pode interferir no resultado do estudo. Isso não quer dizer que a hipótese deva ser rechaçada, porém mais estudos devem ser realizados para relacionar esse tipo de variável, em um período maior de estudo. As condições ambientais pertinentes na região do México (áreas relatadas com grande propensão a infestações pelo vetor) são o fator de risco que fomenta as chances de infecção por *E. canis* em função da idade, permitindo esse tipo de associação. O que irá divergir, de acordo com a região estudada, são as características inerentes a cada região.

A variável comprimento do pelo, apresentou fraca associação estatística (*p*-valor 0,016, IC: 0,36-0,90) neste estudo. Silva et al. (2012) e Paulino et al. (2018), também não encontraram associação estatística em seus resultados.

A variável relacionada ao ambiente urbano x ambiente rural é debatida por diversos autores como um importante fator de risco para a EMC. Sua relevância é limitada ao município, região e ao estado observado (VIEIRA et al. 2013; AGUIAR et al., 2015; BARRANTES-GONZALES et al., 2016; CONSTANTINO, 2017; DANTAS-TORRES, 2018). No presente estudo não se observou associação estatística entre os resultados positivos para *E. canis* nas regiões rurais e urbanas. Existe uma enorme divergência de resultados entre esses trabalhos; no entanto, é necessário que se caracterize de maneira inquestionável o que cada estudo entende como zona urbana e zona rural para que posteriormente seja mais fácil compreender os resultados.

Vieira et al. (2013) relatam uma associação maior de animais soropositivos em zonas urbanas do Paraná; porém, naquele estudo, foi considerado uma zona urbana, uma área com acesso a pasto, onde os cães tinham contato com cavalos, no qual são animais tipicamente característicos em ambientes rurais. A classificação do que torna um ambiente rural em um

país em desenvolvimento, como o Brasil, é difícil, principalmente porque a maioria estrondosa das regiões não se encontram nas metrópoles e por isso os ambientes “urbanos” e “rurais” tornam-se mesclados e difíceis de dividir.

Dantas-Torres (2018), relata que áreas rurais de vilas indígenas no interior de Pernambuco possuem uma incidência maior de *E. canis* quando comparadas a zonas urbanas no mesmo estado. No entanto, ressalta-se que para além da taxa de infestação dos carrapatos e dessa divisão entre zona urbana e zona rural, outros fatores ambientais, como acesso a outros ambientes, clima, temperatura média, pluviosidade estão presentes e podem influenciar no número de animais positivos em cada lugar.

Uma hipótese para a ausência de associação entre as zonas urbanas e rurais neste trabalho está justamente no tamanho de cada município estudado e no desenvolvimento urbano das regiões do interior do estado do Rio de Janeiro. Apesar de ser possível a “olho nu” diferenciar regiões que apresentam maior urbanização, ruas pavimentadas, presença de tratamento de esgoto, itens de saneamento básica, maior número de acesso de linhas de ônibus, número de construções civis etc., os municípios estudados neste trabalho são relativamente pouco populosos e urbanizados.

O município de Petrópolis, que é o município com maior número de habitantes, não ultrapassa os 300.000 habitantes e apresenta um desenvolvimento urbano limitado sendo conhecida como uma cidade de turismo ecológico e histórico e por isso com áreas de urbanização pequenas quando comparadas com regiões metropolitanas, grandes capitais ou outras cidades de porte maior. Portanto, é provável que a variação ambiental do que de fato é um ambiente rural e um ambiente urbano nesses lugares não seja significativa o suficiente para causar uma divergência entre o número de cães positivos para *E. canis* entre as regiões rurais e urbanas do município.

Outra hipótese é de que os animais, mesmo em ambientes rurais, vivem em condições semelhantes às do ambiente urbano, e que por mais que tenham contato com outros carrapatos, eles também têm contato com o *R. sanguineus* s.l. que é a principal espécie de carrapato transmissora de *E. canis* (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

A sensibilidade de animais de raça na doença vem sendo muito discutida ao longo dos anos, inclusive, há relatos de que animais como cães da raça Pastor alemão e Husky siberiano são mais vulneráveis a doença (HARRUS, 1997).

Harrus (1997), em seu estudo, levanta a hipótese de que as diferenças de resistência entre as raças devem a forma diferente que cada raça pode produzir a resposta imunológica, celular

e/ou humorai. Na presente pesquisa, os cães com raça definida apresentavam 1,8 mais risco (p-valor: 0,016; IC:1,12-3,07) na análise multivariada de serem positivos para *E. canis* quando comparados a animais sem raça definida.

Barrantes-Gonzales (2016), relata um resultado diferente cujo animais sem raça definida apresentavam uma frequência maior (55,6%) quando comparados a animais de raça. No entanto, também se justifica em seu estudo que muito possivelmente isso se devesse ao manejo do animal e as medidas de prevenção relatadas pelos tutores desses animais do que a uma resposta imunológica. Animais sem raça definida são considerados animais mais resistentes a doenças, por sua diversidade genética, sendo menos propensos a doenças genéticas causadas por pressão seletiva de genes que tem o intuito de aprimorar raças pré-existentes ou perpetuar características através de melhoramento genético. Essa robustez pode ser um dos motivos para serem menos sensíveis a infecções por *E. canis*.

As sequencias 16S rRNA foram mais conservadas em cães residentes em municípios de Paracambi quando comparado ao Município de Teresópolis. É possível que em Teresópolis existam condições ambientais com uma diversidade maior de espécies de carapatos e que nesses carapatos ocorra uma variação genética maior de *E. canis*. Porém isto é uma hipótese e para que seja validada são necessários mais estudos quanto à variedade de espécies de carapatos e a presença do agente nesses espécimes.

Ehrlichia minasensis, foi identificada em diversas espécies de carapatos, tanto pertencentes ao gênero *Rhipicephalus*, como o gênero *Amblyomma*, *Hyalomma* e *Haemaphysalis*. Apesar do vetor de *E. minasensis* ainda ser desconhecido, esse achado sugere que pode haver mais de um vetor relacionado a esse agente (MURARO et al., 2021). Tal achado pode ser um indicativo do potencial de existirem outras espécies de carapatos como vetores de *E. canis* e ajudar a esclarecer como as divergências genéticas da bactéria podem aumentar quando expostas a diferentes hospedeiros tanto invertebrados quanto vertebrados.

Aguiar et al. (2017) através de análises moleculares de diversos marcadores genéticos, confirmou que *E. minasensis* é uma irmã taxonômica bastante próxima de *E. canis* e que uma análise detalhada do genoma das duas espécies pode contribuir para a compreensão de como funcionou a mudança de hospedeiros das bactérias do gênero *Ehrlichia*.

Bactérias possuem plasticidade genômica, ou seja, um DNA altamente flexível e por isso uma maior capacidade de diversificação genética em função de tempo, quando comparados a indivíduos pluricelulares. Sua replicação acontece de forma mais rápida e, portanto, suas mutações, hibridizações e diversificações em seus genomas podem ser observadas com mais

rapidez (LITCH, 2019). Tendo isso em mente, é esperado que uma vez em contato com outros hospedeiros em ambientes diferentes, o agente acabe por se diversificar geneticamente a fim de se adaptar.

Caracterizações moleculares recentes no Uruguai, realizadas por Felix et al. (2021) apontam novos genótipos de *Ehrlichia sp.* presentes em carrapatos de vida livre (*Ixodes auritulos*). Nele, se ressalta também que esses carrapatos são mais encontrados em aves. É possível que toda essa pressão ambiental estimule de certa forma a diversificação da espécie. Portanto, se em Teresópolis existirem fatores causais que pressionem de alguma forma uma maior diversidade genética do agente aumenta-se a plausibilidade da hipótese. Porém, para isso são necessários mais estudos voltados para este fim.

Todas as sequências genéticas deste estudo se agruparam no clado de *Ehrlichia canis*, o que nos mostra que o 16S rRNA é um ótimo marcador filogenético para avaliar questões taxonômicas, porém não é tão bom para avaliar diversidade genética pelo fato de ser bastante conservados. Essa homogeneidade entre as sequências também foi observada por Pérez-Macchi et al. (2019), quando objetivaram fazer uma caracterização molecular de cepas de *Ehrlichia canis* no Paraguai. De fato, em ambos os estudos seria interessante para uma melhor compreensão da diversidade genética dessas amostras uma avaliação mais detalhada das amostras utilizando além do 16S rRNA, outros marcadores moleculares de regiões menos conservadas para confirmar essa identidade entre as sequências.

6. CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo, a altitude exerceu forte influência sobre os determinantes causais e a frequência da infecção por *E. canis* em cães nas regiões estudadas. Também estiveram associadas à presença do DNA da bactéria, a presença do vetor. Os componentes causais como altitude, presença de carapato, cães domiciliados em ambiente urbano e cães com raça definida, explicam 73% dos casos de *E. canis*. Portanto, estudos epidemiológicos realizados por um período maior poderão excluir situações casuais e aprimorar os resultados e o modelo de regressão logística. A prevenção da infestação por carapatos em cães continua sendo a principal ferramenta para prevenir a disseminação da doença nos animais; logo, todas as amostras sequenciadas encontraram-se dentro do clado de *Ehrlichia canis* e para uma melhor compreensão da variedade genética nessas amostras outros marcadores deverão ser utilizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M., & MELO, A. L. Divergence of the TRP36 protein (gp36) in *Ehrlichia canis* strains found in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, 6(2), 103-105, 2015.
- ALLEN, T. R.; WONG, D. W. Exploring GIS, spatial statistics and remote sensing for risk assessment of vector-borne diseases: a West Nile virus example. International **Journal of Risk Assessment and Management**, 6(4-6), 253-275, 2006.
- ANDRÉ, M. R. Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* agents in terrestrial wild carnivores worldwide: implications for human and domestic animal health and wildlife conservation. **Frontiers in vetererinay Science**, 5, 293, 2018.
- AZEVEDO, S.S.; AGUIAR, D.M.; AQUINO, S.F.; ORLANDELLI, R.C.; FERNANDES, A.R.F.; UCHÔA, 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.** 48, 14–18, 2011.
- BANETH, G., HARRUS, S., OHNONA, F. S., & SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary microbiology**, 136(3-4), 321-325, 2009.
- BARCELLOS, C.; BASTOS, F.I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, n.3, p. 389-397, 1996.
- BARRANTES-GONZÁLEZ, A. V.; JIMÉNEZ-ROCHA, A. E.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J.; DOLZ, G. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 6, p. 1245-1251, 2016.
- 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. **Journal of veterinary internal medicine**, 10(4), 271-274, 1996.
- BEALL, M. J., ALLEMAN, A. R., BREITSCHWERDT, E. B., COHN, L. A., COUTO, C. G., DRYDEN, M. W. & YABSLEY, M. J. (2012). Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. **Parasites & vectors**, 5(1), 1-11, 2012.
- BERNARDES, L.N.C. Tipos de clima do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 14, n. 1, p. 57 - 80, 1952.
- 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. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary parasitology**, 131(1-2), 95–105, 2005.
- BURKHOLDER, W. J., TOLL, P. W. **Small animal clinical nutrition**. 4. ed. Kansas: Mark Morris institute, 401-430 p., 2000.

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

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

CICUTTIN, G. L.; DE SALVO, M. N.; SILVA, D. A., BRITO, M.; NAVA, S. *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato del linaje templado (Acari: Ixodidae), provincia de Buenos Aires, Argentina. **Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias**, v. 16, n. 2, p. 93-96, 2017.

CICUTTIN, G. L.; DE SALVO, M. N.; PÉREZ, P. D.; SILVA, D.; FÉLIX, M. L.; VENZAL, J. M.; NAVA, S. A novel *Ehrlichia* strain (Rickettsiales: Anaplasmataceae) detected in *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae), a tick species of public health importance in the Southern Cone of America. **Pathogens and Global Health**, v. 114, n. 6, p. 318-322, 2020.

CONSTANTINO, C., DE PAULA, E. F. E., BRANDÃO, A. P. D., FERREIRA, F., DA COSTA VIEIRA, R. F., BIONDO, A. W. Survey of spatial distribution of vector-borne disease in neighborhood dogs in southern Brazil. **Open veterinary journal**, 7(1), 50-56, 2017.

COSTA JR, L. M., REMBECK, K., RIBEIRO, M. F. B., BEELITZ, P., PFISTER, K., PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, 174(3), 673-676, 2007.

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

CROMLEY, E. K.; MCLAFFERTY, S. L. GIS and public health. **Guilford Press**, 2011.

CRONEMBERGER, F. M.; VICENS, R. S.; BASTOS, J. S.; FEVRIER, P. V. R.; BARROSO, G. M.; EPIPHANIO, J. C. N.; GALVÃO, L. S. Mapeamento Bioclimático do estado do Rio de Janeiro. XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (JCN Epiphanio & LS Galvão, coords.). **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, Curitiba, 5745-5752, 2011.

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

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

- DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I. D.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18, 20-25, 2009.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & vectors*, 3(1), 1-11, 2010.
- DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, 1(1), 1-17, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. **International Journal for Parasitology: parasites and wildlife**, v. 4, n. 3, p. 452-461, 2015.
- DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 11, p. 724-732, 2007.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, 152(3-4), 173-18, 2008.
- DANTAS-TORRES, Filipe. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2008.
- DANTAS-TORRES, F., DA SILVA, Y. Y., DE OLIVEIRA MIRANDA, D. E., DA SILVA SALES, K. G., FIGUEREDO, L. A., OTRANTO, D. *Ehrlichia* spp. infection in rural dogs from remote indigenous villages in north-eastern Brazil. **Parasites & vectors**, 11(1), 1-6, 2018.
- DARAMOLA, O. O., TAKEET, M. I., OYEWUSI, I. K., OYEKUNLE, M. A., TALABI, A. O. (2018). Detection and molecular characterisation of *Ehrlichia canis* in naturally infected dogs in South West Nigeria. **Acta Veterinaria Hungarica**, 66(1), 85-95, 2018.
- DELMELLE, E. M. Spatial sampling. In *Handbook of regional science* (pp. 1385-1399). Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.
- DONATIEN, A., & LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la société de pathologie exotique**, 28, 418, 1935.
- DURR, P.; GATRELL, A. Gis and spatial analysis in veterinary science. **CABI Publishing**, 319p, 2004.
- FÉLIX, M. L., MUÑOZ-LEAL, S., CARVALHO, L. A., QUEIROLO, D., ALONSO, S. R., NAVA, S., VENZAL, J. M. Molecular characterization of novel *Ehrlichia* genotypes in *Ixodes auritulus* from Uruguay. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, 1, 100022, 2021.
- FULGENCIO, G. O. Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) Chagasi* no município de Belo Horizonte-Estudo clínico e Histopatológico. 2006.

GAL, A., HARRUS, S., ARCOH, I., LAVY, E., AIZENBERG, I., MEKUZAS-YISASCHAR, Y., BANETH, G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. **The Canadian Veterinary Journal**, 48(6), 619, 2007.

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

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

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

HILDEBRANDT, P. K., HUXSOLL, D. L., WALKER, J. S., NIMS, R. M., TAYLOR, R., ANDREWS, M. (1973). Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). **American journal of veterinary research**, 34(10), 1309-1320, 1973.

HINO, P., VILLA, T.C.S., SASSAKI, C.M., NOGUEIRA, J. D. A., SANTOS, C. B. D. Geoprocessamento aplicado à área da saúde. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 6, p. 939-943, 2006.

HUXSOLL, D. L., HILDEBRANDT, P. K., NIMS, R. M., AMYX, H. L., FERGUSON, J. A. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **Journal of wildlife diseases**, 6(4), 220-225, 1970.

IQBAL, Z., CHAICHANASIRIWITAYA, W., RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 32(7), 1658-1662, 1994.

JAIN, V. K.; KUMAR, S. Effective surveillance and predictive mapping of mosquito-borne diseases using social media. **Journal of Computational Science**, 25, 406-415, 2018.

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. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 1, p. 27-32, 2013.

KIM, C. M., KIM, M. S., PARK, M. S., PARK, J. H., CHAE, J. S. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 3(1), 17-26, 2003.

KOMNENOU, A. A., MYLONAKIS, M. E., KOUTI, V., TENDOMA, L., LEONTIDES, L., SKOUNTZOU, E., OFRI, R. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary ophthalmology**, 10(3), 137-142, 2007.

KUKRETI, K.; PANDEY, L.; DAS, M.; RASTOGI, A.; DUBEY, R.; SHARMA, P. Prevalence of canine monocytic ehrlichiosis in canine population across India. **Archives of Razi Institute**, 73(2), 87-93, 2018.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, 35(6), 1547–1549, 2018.

LABRUNA M. B, PEREIRA M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, 30:24–32, 2001.

LASTA C. S., DOS SANTOS A. P., MESSICK J. B., OLIVEIRA S. T., BIONDO A. W., GONZÁLEZ F. H. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 22: 360–366, 2013.

Lauzi, S., Maia, J. P., Epis, S., Marcos, R., Pereira, C., Luzzago, C., SANTOS, M.; PAYO, P. P.; GIORDANO, A.; PAJARO, M.; SIRONI, G.; Faustino, A. Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Rickettsia monacensis* in dogs from Maio Island of Cape Verde archipelago. **Ticks and tick-borne diseases**, 7(5), 964-969, 2016.

LEWIS JR, G. E., RISTIC, M., SMITH, R. D., LINCOLN, T., STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimentais hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, 38(12), 1953-1955, 1977.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, 40(6), 1121-1140, 2010.

LOVERING, S. L.; PIERCE, K. R.; ADAMS, L. G. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. **Am J Vet Res**, v. 41, n. 8, p. 1266-1271, 1980.

MAEKAWA, N.; KONNAI, S.; BALBIN, M. M.; MINGALA, C. N.; GICANA, K. R.; BERNANDO, F. A.; MURATO, S.; OHASHI, K. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in a Philippine dog. **Ticks and tick-borne diseases**, 9(2), 266-269, 2018.

MALIK, M. I.; QAMAR, M.; AIN, Q.; HUSSAIN, M. F.; DAHMANI, M.; AYAZ, M.; MAHMOOD, A. K.; DAVOUST, B.; SHAIKH, R. S.; IQBAL, F. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). **Veterinary medicine and science**, 4(2), 126-132, 2018.

MARTINS, I. V.F.; DE AVELAR, B., R.; FREITAS, D., F. Capítulo 5-O uso do sig (sistemas de informações geográficas) como ferramenta na parasitologia veterinária. **Tópicos especiais em Ciência Animal I**, p. 42, 2012.

MATHEMA, V. B.; MANZOOR, Z.; KOO, J. E.; KOH, Y. S. Inhibition of cell death of bone marrow-derived macrophages infected with *Ehrlichia muris*. **Ticks and tick-borne diseases**, 4(3), 185-190, 2013.

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**, 71(5), 2516-2524, 2003.

MCDADE, Joseph E. Ehrlichiosis—a disease of animals and humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.

MYLONAKIS, M. E.; HARRUS, S.; BREITSCHWERDT, E. B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The veterinary journal**, v. 246, p. 45-53, 2019.

MIGLIORE, S., GARGANO, V., DE MARIA, C., GAMBINO, D., GENTILE, A., VITALE BADACO, V., DI BELLA, S. A Cross Sectional Study on Serological Prevalence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia conorii* in Different Canine Population of Sicily (South-Italy) during 2017–2019. **Animals**, 10(12), 2444, 2020.

MIRCEAN, V., DUMITRACHE, M. O., GYÖRKE, A., PANTCHEV, N., JODIES, R., MIHALCA, A. D., COZMA, V. Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 12(7), 595-604, 2012.

MIRÓ, G., MONTOYA, A., ROURA, X., GÁLVEZ, R., SAINZ, A. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. **Parasites & Vectors** 6, 117, 2013.

MITTAL, M., KUNDU, K., CHAKRAVARTI, S., MOHAPATRA, J. K., NEHRA, K., SINHA, V. K., KUMAR, A. Canine Monocytic Ehrlichiosis among working dogs of organised kennels in India: A comprehensive analyses of clinico-pathology, serological and molecular epidemiological approach. **Preventive veterinary medicine**, 147, 26-33, 2017.

MONTOYA-ALONSO, J. A.; MORCHÓN, R.; COSTA-RODRÍGUEZ, N.; MATOS, J. I.; FALCÓN-CORDÓN, Y.; CARRETÓN, E. Current distribution of selected vector-borne diseases in dogs in Spain. **Frontiers in Veterinary Science**, p. 840, 2020.

MORAES-FILHO, J., KRAWCZAK, F. S., COSTA, F. B., SOARES, J. F., LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLoS One**, 10(9), e0139386, 2015.

MOURA DE AGUIAR, D., PESSOA ARAÚJO JUNIOR, J., NAKAZATO, L., BARD, E., AGUILAR-BULTET, L., VORIMORE, F., CABEZAS-CRUZ, A. Isolation and characterization of a novel pathogenic strain of *Ehrlichia minasensis*. **Microorganisms**, 7(11), 528, 2019.

MRLJAK, V., KULEŠ, J., MIHALJEVIĆ, Ž., TORTI, M., GOTIĆ, J., CRNOGAJ, M., BARIĆ RAFAJ, R. Prevalence and geographic distribution of vector-borne pathogens in apparently healthy dogs in Croatia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 17(6), 398-408, 2017.

MURARO, L. S.; NOGUEIRA, M. F.; BORGES, A. M. C. M.; DE OLIVEIRA SOUZA, A.; VIEIRA, T. S. W. J.; DE AGUIAR, D. M. Detection of *Ehrlichia* sp. in Amblyomma sculptum parasitizing horses from Brazilian Pantanal wetland. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 12(3), 101658, 2021.

NAVA, S., ESTRADA-PEÑA, A., PETNEY, T., BEATI, L., LABRUNA, M. B., SZABÓ, M. P., GUGLIELMONE, A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, 208(1-2), 2-8, 2015.

NAVARRETE, M. G., CORDEIRO, M. D., SILVA, C. B., MASSARD, C. L., LÓPEZ, E. R., RODRÍGUEZ, J. C. A., FONSECA, A. H. Serological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* and associated risk factors in dogs domiciled in western Cuba. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, 14, 170-17, 2018.

NORSTROM, M. Geographical Information System (GIS) as a Tool in Surveillance and Monitoring of Animal Diseases. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.42, n.1, p.79-85, 2001.

NYINDO, M. B., RISTIC, M., HUXSOLL, D. L., SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent--*Ehrlichia canis*. **American journal of veterinary research**, v. 32, n. 11, p. 1651-1658, 1971.

OJEDA-CHI M. M., RODRIGUEZ-VIVAS R. I., ESTEVE-GASENT M. D., PÉREZ DE LEÓN A. A., MODARELLI J. J., VILLEGAS-PEREZ S. L. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. **Comparative immunology, microbiol and infectious diseases**, 67:101351, 2019.

ORJUELA, C.; GARCÍA A, G. F.; IMBACHI, J. G. Epidemiological analysis of the presentation of *Ehrlichia* sp. canine in Florencia Caquetá, Colombia. **REDVET**, 16(6), 2015.

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

PARKS, D. H.; RINKE, C.; CHUVOCHINA, M.; CHAUMEIL, P. A.; WOODCROFT, B. J.; EVANS, P. N.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature microbiology**, 2(11), 1533-1542, 2017.

PEGRAM, R. G.; KEIRANS, J. E.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Systematic Parasitology**, v. 10, n. 1, p. 27-44, 1987.

PELEG, O.; BANETH, G.; EYAL, O.; INBAR, J.; HARRUS, S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. **Veterinary parasitology**, 173(3-4), 292-299, 2010.

PÉREZ-MACCHI, S., PEDROZO, R., BITTENCOURT, P., MULLER, A. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 62, p. 31-39, 2019.

POSADA, D., CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** (Oxford, England), 14(9), 817-818, 1998.

RANDOLPH, S. E. Evidence that climate change has caused ‘emergence’ of tick-borne diseases in Europe? **International Journal of Medical Microbiology Supplements**, v. 293, p. 5-15, 2004.

RIKIHISA, Y., EWING, S. A., & FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of clinical microbiology**, 32(9), 2107-2112, 1994.

SAITO, T., WALLER, D. H. Ehrlichioses: an important one health opportunity. **Veterinary sciences**, Basel, v. 3, n. 4, 2016.

SANTOS, L. G. F. D.; MELO, A. L. T.; JAUNE, F. W.; ZILIANI, T. F.; GIRARDI, Â. F.; AGUIAR, D. M. D. Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 470-474, 2013.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Research Communications**, 26(3), 171-177, 2002.

SIARKOU, V. I.; MYLONAKIS, M. E.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; KOUTINAS, A. F. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. **Veterinary microbiology**, 125(3-4), 304-312, 2007.

SILVA, G. C. F. D., BENITEZ, A. D. N., GIROTTI, A., TARODA, A., VIDOTTO, M. C., GARCIA, J. L., VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21, 379-385, 2012.

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

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M. R.; HUXSOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **American journal of veterinary research**, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.

SOLANO-GALLEGO, L., LLULL, J., OSSO, M., HEGARTY, B., BREITSCHWERDT, E. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Veterinary research**, 37, 231–244, 2006.

STICH, R. W., RIKIHISA, Y., EWING, S. A., NEEDHAM, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 540-546, 2002.

STICH, R.W., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., CARPENTER, C., CORTINAS, M.R., EWING, S. A., FOLEY, D., FOLEY, J.E., GAFF, H., HICKLING, G.J., LASH, R.R., LITTLE, S.E., LUND, C., LUND, R., MATHER, T.N., NEEDHAM, G.R., NICHOLSON, W.L., SHARP, J., VARELA-STOKES, A., WANG, D., Quantitative factors proposed to influence

the prevalence of canine tick-borne disease agents in the United States. **Parasites & Vectors** 7, 417, 2014.

STRAUBE, Juliane. Erliquiose canina – da infecção aguda a doença crônica. **Boletim CVDB**, 2011. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/vetsmart-contents/Documents/DC/Bayer/Boletim_CVBD_Erliquiose.pdf. Acesso em: 15 dez. 2021.

SZABÓ, M., MANGOLD, A. J., JOÃO, C. F., BECHARA, G. H., GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, p. 131-140, 2005.

TAMURA, K. A.; GIAMPAOLI, V. New prediction method for the mixedlogistic model applied in a marketing problem. **Computational Statistics and Data Analysis**, 2013

TRAPP, S. M., DAGNONE, A. S., VIDOTTO, O., FREIRE, R. L., AMUDE, A. M., DE MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary parasitology**, 140(3-4), 223-230, 2006.

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**, 20(1), 01-12, 2011.

VIEIRA, R. F. D. C., VIEIRA, T. S. W. J., NASCIMENTO, D. D. A. G., MARTINS, T. F., KRAWCZAK, F. S., LABRUNA, M. B., VIDOTTO, O. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 55(5), 335-340, 2013.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). **A guide to the brown ticks of the world**. London, Cambridge Univ. Press. p. 643, 2000.

WANER, T., HARRUS, S., BARK, H., BOGIN, E., AVIDAR, Y., KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary parasitology**, 69(3-4), 307-317, 1997.

WEBER, A. A.; WOLLMANN, C. A. Mapeamento dos incêndios residências na área urbana de Santa Maria, RS, Brasil utilizando o estimador de densidade Kernel. **Investigaciones Geográficas**, (51), 49, 2016.

WOODY, B. J., HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 21(1), 75-98, 1991.

YOSHIZAWA, M. A. C., SOUZA, J. L., BREDT, A., BAGGIO, D. Ectoparasitos de *Rattus norvegicus* no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 1, p. 39-42, 1996.

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ CPF/RG: _____
endereço: _____,
telefone: _____ recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães,
autorizo a coleta de material biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será
preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na
realização dos exames.

Em ____/____/____

Assinatura: _____

APÊNDICE II

Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães domiciliados.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: ____ / ____ / ____ Propriedade Nº _____ Zona: () Rural () Urbana

Localidade: _____ Altitude:

Coord. Geográf.: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

Pt de referência: _____

Temperatura ambiente: _____

Tel: _____

e-mail: _____

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

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

3) Tipo de vegetação predominante: _____

4) Quantos cães possui em casa? _____

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

6) Leva o cão ao veterinário? sim () não () Qual a 7) Periodicidade? _____

8) Presença de outras espécies domésticas:

() gatos

() bovinos

() equinos

() outros: Quais?.....

9) Presença de animais silvestres:

() gambá

() roedores

() outros: Quais? _____

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

11) O proprietário conhece alguma doença transmitida por carrapatos? Qual?

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

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

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

Conhece o nome do vetor ()

Conhece a forma de transmissão ()

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

() sim () não

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

16) Escolaridade:

() Nunca frequentou a escola primária

() 1º grau incompleto

() 1º grau completo

() 2º grau incompleto

() 2º grau completo

() superior

17) Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? _____

18) Utiliza produtos inseticidas no ambiente? () sim () não

19) Quais? _____ Intervalos? _____

20) Utiliza mat. **físicos** de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

() sim () não

21) Quais? _____ Intervalos? _____

Outras obs relevantes:

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL N° _____

Data: ___/___/___ Propriedade Nº ____ Zona: () Rur () Urb Localidade: _____

Proprietário: _____

Nome do animal: _____ Sexo: () Macho () Fêmea Raça: _____

Cor: _____ Idade: _____ Peso estimado: _____

1) Animal Castrado? () Sim () Não

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

3) Há qt tempo está com o animal? _____

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

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

6) Pêlo: () curto () médio () longo

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

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

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

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

Apresenta _____ algum sintoma _____ atualmente?
Qual? _____

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

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

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

Histórico de patologias anteriores: _____

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

15) Como diagnosticou? () clinicamente () laboratorialmente () outras

16) Foi tratado? () sim () não

17) Lembra do tratamento? se sim, qual? _____

18) Fez uso de algum medicamento recente? Qual?

19) Tipo de alimentação: () comida () ração () ambos

Marca da ração _____

20) Tipo de comidas e petiscos que come:

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

Se não, come quantas vezes ao dia: _____

22) Vermifugação: () sim () não Há qto tempo? _____

23) Qual produto? _____

24) Critério para escolha: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

25) Possui ectoparasitos? () sim () não

26) Quais e quantidade? (+)

() pulgas _____

() piolhos _____

() sarnas _____

() carapatos _____ Fases: _____ espécies: _____

27) Faz tratamento? () sim () não Qual produto? _____

28) Se não trata, qual motivo? _____

29) Critério para escolha do produto:

() indicação

() balconista

() veterinário

() propaganda

30) Hábito do animal?

() sempre preso

() preso de dia e solto à noite

() solto

() outros __

31) Apresenta abrigo? () sim () não Tipo: _____

32) Tipo de ambiente do animal:

() cimentado

() de terra

() gramado

() outros

33) Freq de recolhimento e limpeza das fezes:

() diariamente () 2 a 3 x por sem

() 1 x por semana

Exame físico:

Temperatura: ____ Pulso: ____ FR: ____ FC: ____ TPC: ____ Turgor: _____ Linfonodos: _____

Mucosa ocular: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Mucosa oral: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Outras alterações sanitárias atuais: _____

Secreção ocular: _____

Distúrbios atuais de coagulação na pele: () petéquias () equimoses () outros: _____

Observações sobre a saúde do animal ao exame físico:

Dermatopatias? () sim () não

Sinais de otite? () sim () não

Outros tipos de lesões: _____

() não faz

Tem assistência Veterinária? () sim () não

Frequênciа? () a cada 6 meses () 1 x por ano () só qd fica doente

Animal é vacinado? () sim () não Quais vacinas? _____

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

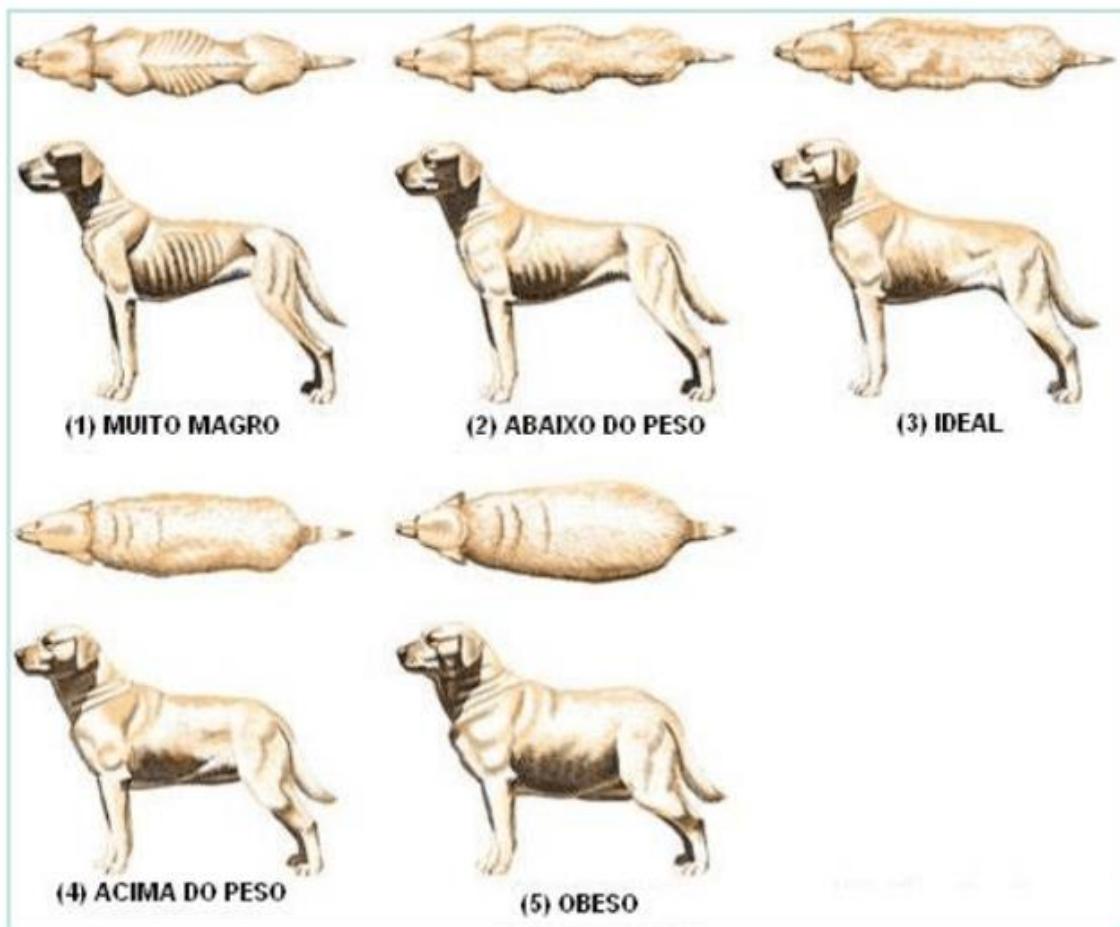
Usa produtos parasiticidas? () sim () não Quais? _____

Outras obs relevantes: _____

Condição de limpeza do ambiente do animal:

() ruim () moderada () satisfatório

ANEXO I



Classificação do escore de condição corpórea canina no sistema corporal de 5 pontos (Burkholder W. J. & Toll P. W., 200