



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CAMPINA GRANDE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**CAMPUS DE PATOS-PB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***Rickettsia felis* e *Ehrlichia canis* em cães do semiárido brasileiro: diagnóstico  
sorológico, molecular e fatores associados**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento do requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**ATTICUS TANIKAWA**

**PATOS-PB**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**CAMPUS DE PATOS-PB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***Rickettsia felis* e *Ehrlichia canis* em cães do semiárido brasileiro: diagnóstico sorológico, molecular e fatores associados**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento do requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**ATTICUS TANIKAWA**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo**

**PATOS-PB**

**2012**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Dados de Acordo com AACR2, CDU e CUTTER

Biblioteca Central

Tanikawa, Atticus.

T161r      *Rickettsia felis* e *Ehrlichia canis* em cães do semiárido brasileiro: diagnóstico sorológico, molecular e fatores associados. / Atticus Tanikawa. –Patos - PB, 2012.

51 f.: il. Color.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)

Programa De Pós-Graduação Em Medicina Veterinária

Centro de Saúde e Tecnologia Rural,

Universidade Federal de Campina grande

1. Doenças transmitidas por carrapatos; 2. Cães;

3. Carrapatos; 4. RIFI; 5. PCR; 6. Nordeste

Brasileiro.

I.Título. II. Universidade Federal de Campina Grande

BC

CDU: 619

NOME: TANIKAWA, Atticus

Título: *Rickettsia felis* e *Ehrlichia canis* em cães do semiárido brasileiro: diagnóstico sorológico, molecular e fatores associados

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento do requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Apresentada em 20 / 04 / 2012

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo**  
Presidente da Banca

**Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Célia Rodrigues Athaíde**  
Membro titular

**Prof. Dr. Maurício Cláudio Horta**  
Membro titular

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe Harumi  
Tanikawa por todo amor,  
confiança e apoio a mim  
dedicados.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me acompanhou nesta longa jornada, me dando paz e iluminando o meu caminho durante todo este período.

A Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, pela minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande, na pessoa do Prof. Dr. *Franklin-Riet-Correa* pela oportunidade concedida.

Ao meu orientador Prof. Dr. *Sérgio Santos de Azevedo* a quem ofereço a minha imensa gratidão por tudo que fizeste por mim principalmente pela confiança cedida durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. *Marcelo Bahia Labruna* e Prof. Dr. *Daniel Moura Aguiar* pelo auxílio no desenvolvimento das provas sorológicas e moleculares.

*Ana Lucélia de Araújo (Lulu)*, minha amiga e grande companheira a quem devo o meu amor, admiração, ensinamentos, atenção e respeito.

A *Andréia Melo* pela preparação das lâminas e execução dos testes sorológicos para erliquiose.

Aos Pós-Graduandos da UFCG *Rodrigo (Bucho)*, *Gildeni (Codeba)*, *Diego (Catolé)*, *Tatiane (Tati)*, *Beatriz (Bia)*, *Milena*, *Soraia*, *Rodrigo Mendes (Zoi)*, *Leonardo (Leozinho)*, *Cícero Vanderlô (Lolô)*, *Adriana (Pocotó)*, *Fabricio (Gago)*, *Alan (Zé Doido)*, *Vanessa*, *Clarise (Paquita)* pelos momentos de alegria, ensinamento e

descontração principalmente na sala de estudo. Em especial a *Marcel Bezerra de Lacerda (Oreia)* grande amigo desde o período da Graduação.

Aos Pós-Graduandos do VPS em especial a *Francisco Borges e Andrea Costa* pelo auxílio e pela amizade a mim conferida.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFCG em especial a *D. Fátima, D. Nenê, D. Socorro, Erotide, Neide e ao Renatinho* o “Quase nordestino” do VPS- USP.

As residentes *Angélica e Larissa* pela paciência e compreensão durante o momento das colheitas.

Aos meus colegas veterinários *José Luiz Santana (Luizinho) e Matheus Alves (Teteu)* pelos incentivos.

Aos colegas de apartamento *Pedro Gustavo, Michel* pelos momentos descontração e harmonia.

Aos professores Drs. *Pedro Isidro, Rosangela Nunes, Almir de P. Souza, Eldinê de Miranda, Sara Vilar, Gildenor Xavier, João Moreira* pelos ensinamentos, convívio e atenção aos animais.

A médica Veterinária Msc *Rosileide Carneiro* por todo ensinamento prestado.

Ao secretário da Pós-Graduação *Jonas Alves* pelo auxílio nos tramites necessários para a conclusão da dissertação.

Aos meus conterrâneos e amigos *Adalton (Adalto), Cesar (Cesinha), Evaristo (Chico), Danilo (Dinho), Ciro (Cirola), Bruno (Aranha) Glauber (Baixinho) e Marcus (Marquinho)* torcedores fanáticos do Esporte Clube Bahia. “Bora Bahea”

A minha *batchan* *Mina*, a querida tia *Hitomi* e primos *Yuri* e *Kenji* pelo apoio amizade e companheirismo conferido durante todos estes anos.

Aos demais membros da família *Tanikawa* a quem eu devo a minha origem.



*Um cão não se importa se você é  
rico ou pobre, educado ou analfabeto,  
inteligente ou burro. Se você lhe der  
seu coração, ele lhe dará o dele.*

*Jonh Grogan*

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	xi
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xii
<b>Resumo</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	12
<b>Introdução</b> .....	13
<b>Referências</b> .....	14
<b>Capítulo I - Detecção de <i>Rickettsia felis</i> em carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i>, Nordeste do Brasil</b> .....	15
Resumo .....	16
Abstract .....	16
Introdução .....	17
Agradecimentos .....	19
Referências .....	19
<b>Capítulo II - <i>Ehrlichia canis</i> em cães no semiárido do Nordeste Brasil: sorologia, detecção molecular e fatores associados</b> .....	23
Resumo .....	24
Abstract .....	25
Introdução .....	26
Material e Métodos .....	27
Resultados .....	31
Discussão .....	32
Referências .....	35
<b>Conclusões Gerais</b> .....	50
<b>Anexos</b> .....	51

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Capítulo I</b>	
Figura I. Localização espacial da Cidade de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil .....	17
<b>Capítulo II</b>	
Figura I. Localização espacial da Cidade de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil .....	43
Figura II. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicons do gene <i>dsb</i> de <i>Ehrlichia spp</i> para as amostras de DNA para os cães amostrados durante o estudo no Hospital Veterinário.....	44

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Capítulo II</b>	
<b>Tabela 1.</b> Comparação entre sorologia e a PCR para os cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil .....	<b>38</b>
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre a presença de mórulas com a PCR para os cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil .....	<b>39</b>
<b>Tabela 3.</b> Associação entre achados dos exames hematológicos e resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR), em cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil .....	<b>40</b>
<b>Tabela 4.</b> Análise dos fatores de associados a infecção pela <i>Ehrlichia canis</i> pelo Teste Qui-Quadrado ( $X^2$ ) para os cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil .....	<b>41</b>

## RESUMO

As doenças transmitidas por carrapatos são enfermidades que apresentam uma alta frequência na rotina Médica de Pequenos Animais produzindo quadros clínicos de apatia, anorexia e hipertemia. Dentre estas enfermidades as Rickettsiales apresentam grande importância devido ao potencial zoonótico existente. Esta dissertação é formada por dois artigos originais. O primeiro foi submetido à revista *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* identificando pela primeira vez a presença de *Rickettsia felis* em carrapatos no Nordeste Brasileiro através de técnicas moleculares. O segundo capítulo foi submetido à revista *Research in Veterinary Science* abordando a ocorrência de uma alta frequência de cães positivos na RIFI (69,4%) e uma baixa frequência na PCR (3,7%). Observou-se que os principais fatores associados a infecção pela *Ehrlichia canis* nos cães foram relacionados ao ambiente de permanência dos animais e a frequência de limpeza realizada nos ambientes. Concomitantemente analisaram-se as principais alterações hematológicas associadas com a positividade na PCR. Leucopenia, eosinopenia, linfopenia foram as variáveis hematológicas associadas com a análise estatística.

**PALAVRAS-CHAVES:** Doenças transmitidas por carrapatos; cães; carrapatos; RIFI; PCR; Nordeste Brasileiro

## **ABSTRACT**

The tick-borne diseases have a high frequency in dogs pets producing clinical signs of apathy, anorexia and hyperthermia. Among the Rickettsiales these diseases are very important due to the zoonotic potential exists. This dissertation consists of two original articles. The first was submitted to the Brazilian Journal of Veterinary Parasitology first identifying the presence of *Rickettsia felis* in ticks in Northeast Brazil by molecular techniques. The second chapter was submitted Research in Veterinary Science addressing the occurrence of a high frequency of positive dogs in IFA (69.4%) and a low frequency in the PCR (3.7%). It was observed that the main factors associated with infection by *Ehrlichia canis* in dogs were related to the environment when the animals and the frequency of cleaning performed environments. Concomitantly analyzed the main hematological associated with positivity in the PCR. Leukopenia, eosinopenia, lymphopenia were haematological variables associated with the statistical analysis.

**KEYWORDS:** Tick-borne diseases, dogs, ticks, IFA, PCR, Northeast Brazil

## INTRODUÇÃO

A reemergência de doenças transmitidas por artrópodes é um desafio para a medicina veterinária e humana. Dentre estes, os carrapatos têm despertado o interesse da comunidade científica e da saúde pública devido a sua participação na transmissão de doenças riquetisiais (SHAW et al., 2001; FÖLDVÁRI et al., 2005). A subnotificação das doenças em cães pode ocorrer devido ao conhecimento limitado da epidemiologia, aliado à ocorrência de sinais clínicos inespecíficos e à falta de inclusão no diagnóstico diferencial com outras doenças febris (SHAW et al., 2001). Por isso o estudo da epidemiologia das riquetsioses torna-se indispensável para o conhecimento da magnitude dessas infecções na região Nordeste visto que existem poucos estudos relatando a identificação dos agentes causais e seu potencial zoonótico.

Esta dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, é composta de dois capítulos constituídos por artigos científicos originais, cumprindo assim com as exigências do programa.

No primeiro capítulo é relatada a primeira identificação de *Rickettsia felis* infectando carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* no Nordeste do Brasil, enquanto que o segundo capítulo aborda um inquérito sorológico, detecção molecular e fatores associados à ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães na região semiárida do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FÖLDVÁRI, G.; HELL, É.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Veterinary Parasitology**, v.127,p. 221–226, 2005.
2. SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v.17, n.2, p. 74-8, 2001.



## CAPÍTULO I

### **Detecção de *Rickettsia felis* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, Nordeste do Brasil**

Manuscrito submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária/UNESP – Jaboticabal.

## **Detecção de *Rickettsia felis* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, Nordeste do Brasil**

Detection of *Rickettsia felis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Northeastern Brazil

Atticus Tanikawa<sup>1</sup>; Francisco Borges Costa<sup>2</sup>; Marcelo Bahia Labruna<sup>2</sup>; Sérgio Santos de Azevedo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - USP

### **Resumo**

A riquetsiose transmitida por pulgas, causada pela *Rickettsia felis*, é uma doença emergente relatada em todo o mundo. Dentre 22 carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* colhidos de cães no Nordeste do Brasil, *Rickettsia felis* foi detectada em um (4,5%) espécime, sugerindo que este carrapato pode ser um vetor alternativo da riquetsiose transmitida por pulgas no Brasil.

**Palavras-chave:** Riquetsioses, área não-endêmica, Estado da Paraíba.

### **Abstract**

Flea-borne rickettsiosis, caused by *Rickettsia felis*, is an emerging disease that has been reported worldwide. Among 22 *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected from dogs in Northeastern Brazil, *Rickettsia felis* was detected in one (4.5%) specimen, suggesting that this tick may be an alternative vector of flea-borne rickettsiosis in Brazil.

**Keywords:** Rickettsiosis, non-endemic area, Paraíba State.

### **Introdução**

---

\* **Autor para correspondência:** Sérgio Santos de Azevedo  
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Av. Universitária, s/nº, CEP 58700-970, Patos, PB, Brazil **e-mail:** sergio.azevedo@pq.cnpq.br

A riquetsiose transmitida por pulgas, causada pela *Rickettsia felis*, é uma doença emergente que tem sido relatada em todo o mundo, incluindo o Brasil (PAROLA et al., 2005). O agente causal foi detectado primeiramente por Adams et al. (1990) em células do intestino de uma pulga de gato (*Ctenocephalides felis*), sendo mais tarde descrita como uma nova espécie de *Rickettsia* (BOUYER et al., 2001). Casos de infecção humana foram registrados em várias ocasiões com sintomas similares aos da Dengue, incluindo febre, cefaléia, mialgia e exantema macular (PEREZ-OSÓRIO et al., 2008).

No Brasil, quatro espécies de *Rickettsia* têm sido associadas com doenças humanas, a saber: Febre Maculosa Brasileira, causada pela *Rickettsia rickettsii*; Tifo Murino, causado por *R. typhi*; Febre Maculosa da Mata Atlântica, causada pela *R. parkerii*; e Febre Maculosa transmitida por pulgas, causada pela *R. felis* (LABRUNA et al., 2011). Relatos destes agentes têm sido registrados no sudeste do Brasil e na porção sul do estado da Bahia, próxima a região Sudeste (LABRUNA et al., 2011; SILVA et al., 2011.) No presente trabalho é relatada a detecção de *R. felis* em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* no Nordeste do Brasil, em região não endêmica para *Rickettsia* sp., onde nenhuma espécie foi relatada anteriormente.

Um total de 108 amostras de sangue e 22 carrapatos foram coletados de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, no município de Patos, durante 2010 e 2011 (Figura 1). Cerca de 4 ml de sangue foi coletado de cada cão por venopunção das veias cefálica ou jugular. Os soros obtidos foram armazenados em microtubos de 1,5 ml estéreis, e armazenados a – 20 °C até a realização dos testes sorológicos. Os carrapatos foram removidos e armazenados a – 20 °C para depois serem identificados taxonomicamente com base em características morfológicas.

O diagnóstico sorológico foi realizado pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando antígenos de seis isolados de riquetsias do Brasil (*R. rickettsii*, *R. parkerii*, *R. amblyommii*, *R. felis*, *R. rhipicephalii* e *R. belli*) (LABRUNA et al., 2007).

A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo de tiocianato de guanidina (SANGIONI et al., 2005). Para este propósito, cada carrapato foi colocado em microtubo de 1,5 mL contendo 150 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7,4) e homogeneizado usando um micropistilo estéril. Em seguida, 450 µL de tiocianato de guanidina (5 mol/L) foi adicionado ao tubo, o qual foi agitado em

vórtex e incubado novamente por 10 minutos à temperatura ambiente homogeneizando brevemente no vórtex a cada 2 minutos. O tubo foi centrifugado a 12000 g durante 5 minutos para separar a fase aquosa, que foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, 600 µL de isopropanol foi adicionado à fase aquosa (400 µL), o qual foi homogeneizado por várias vezes por inversão e, em seguida, incubado a -20° C *overnight*. Logo após, o tubo foi centrifugado a 12000 g durante 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e depois ressuspenso em 30 µL de tampão TE. Finalmente, os microtubos foram incubados a 56° C durante 15 minutos para facilitar a homogeneização do DNA e, em seguida, armazenados a -20 ° C até serem testados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Cinco microlitros do DNA extraído de cada carrapato foram utilizados para a amplificação de um fragmento 401-bp do gene *gltA* de *Rickettsia* sp. utilizando os *primers* CS-62 (*forward*) e CS-462 (*reverse*) (LABRUNA et al., 2004). As PCRs (25 µL) foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 2700) pela adição de 5 µL do molde de DNA para 12,5 µL do iQ Supermix PCR, 1,0 µL de cada iniciador a 20 µM, e 5,5 µL de água molecular. Para cada reação, um controle negativo (água) e um controle positivo (DNA de *R. parkeri*) foram incluídos. Dez microlitros do produto da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, e examinado por transiluminação de UV. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados (HORTA et al., 2007). Sequências parciais foram submetidos a análise BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para determinar semelhanças com outras espécies de *Rickettsia*. No total, um carrapato da espécie *R. sanguineus* (4,5%) produziu bandas esperadas na PCR, que demonstraram pelo sequenciamento do DNA ser idêntica à sequência correspondente do gene *gltA* de *R. felis* em 99,5% de especificidade depositada no GenBank (CP000053).

Todos os carrapatos foram identificados como *R. sanguineus*. Todos os cães foram soronegativos para os antígenos utilizados (*R. rickettsii*, *R. parkerii*, *R. amblyommii*, *R. felis*, *R. rhipicephalii* e *R. belli*), corroborando a condição não-endêmica do Nordeste do Brasil para Febre Maculosa. Por outro lado, o DNA do agente patogênico humano *R. felis* foi detectado em um dos carrapatos que se alimentavam dos cães. Esse agente está principalmente associado com pulgas do gênero *Ctenocephalides*, que estão entre os ectoparasitas mais comuns em cães no Brasil, incluindo a região Nordeste (DANTAS-TORRES et al., 2009). Desde a descoberta da possibilidade das pulgas *Ctenocephalides* sp. estarem infectadas pela *R. felis* (PEREZ-

OSORIO et al., 2008), é provável que tenham sido a fonte de infecção de *R. felis* para o *R. sanguineus*, enquanto se alimentavam dos cães, embora os mecanismos de transmissão horizontal ainda permanecerem desconhecidos.

Curiosamente, os cães parecem ser refratários a infecção por *R. felis* porque vários estudos falharam em detectar anticorpos contra *R. felis* em cães que vivem sob infestações naturais por pulgas infectadas com *R. felis* (HORTA et al, 2007; PINTER et al, 2008). Esta afirmação corrobora os resultados negativos nos cães do presente estudo.

Dois relatos de detecção *R. felis* em carrapatos *R. sanguineus* foram registrados no Brasil, ambos em regiões endêmicas para Febre Maculosa Brasileira na região Sudeste (CARDOSO et al, 2006;. OLIVEIRA et al, 2008). Nosso estudo relata a primeira detecção de uma espécie de *Rickettsia* no Nordeste do Brasil (excluindo o sul da Bahia, que está no limite sul do Nordeste do Brasil). Apesar de pulgas *C. felis* serem consideradas o principal vetor de *R. felis*, os resultados do presente trabalho sugerem que o *R. sanguineus* pode ser um vetor alternativo para a Febre Maculosa transmitida por pulgas no Brasil.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a Rodrigo Mendes e Soraia Justiniano por sua valiosa ajuda durante o trabalho de campo, e a Andréa Costa pelo apoio durante a sorologia.

### **Referências**

Adams JR, Schmidtman ET, Azad AF. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouché), with a rickettsia-like microorganism. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(4): 400–409.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3): 403-410.

Bouyer DH, Stenos J, Crocquet-Valdes P, Moron CG, Popov VL, Zavala-Velazquez JE, et al. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(2): 339–347.

Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CVB, Figueira FCB, Labruna MB, et al. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2006; 22(3): 495-501.

Dantas-Torres F, Melo MF, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(3): 75-77.

Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TTS. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(7): 793-801.

Labruna MB, McBride JW, Bouyer DH, Camargo LM, Camargo EP, Walker DH. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *J Med Entomol* 2004; 41(3): 533-537.

Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MP. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from ticks *Haemaphysalis juxtakochi* in the state of Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(3): 869–873.

Labruna MB, Mattar VS, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Abarca K, et al. *Rickettsioses* in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev MVZ Cordoba* 2011; 16(2): 2435-2457.

Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CCA, Silva Júnior A, Almeida MR, Almada G, et al. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian spotted fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(2): 191-194.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne *Rickettsioses* around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 719-756.

Perez-Osorio CE, Zavala-Velázquez JE, Arias León JJ, Zavala-Castro JE. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(7): 1019-1022.

Pinter A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of Sao Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2008; 24(2): 247–252.

Sangioni LA, Horta MC, Vianna MC, Gennari SM, Soares RM, Galvão MA, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(2): 265-270.

**Legenda da figura**

**Figura I.** Localização espacial do Município de Patos, Estado da Paraíba, nordeste do Brasil.

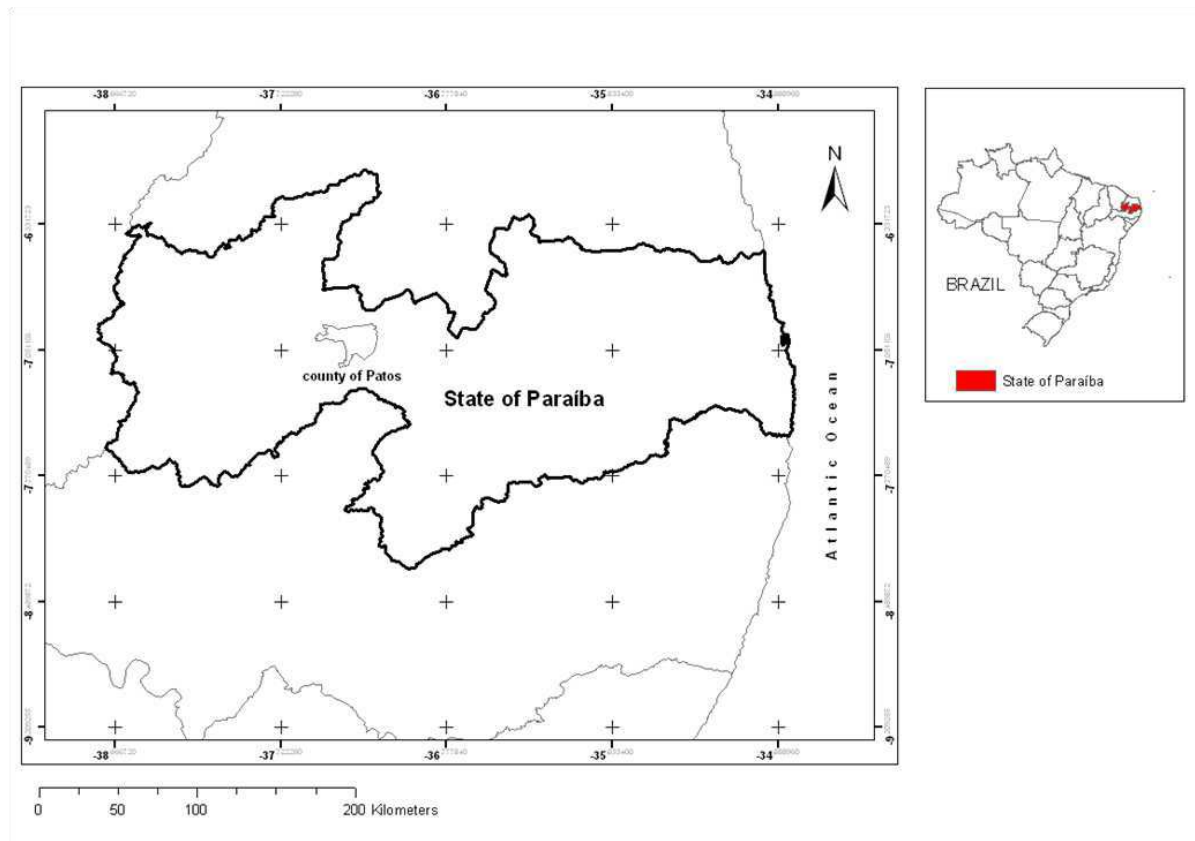


Figura 1



## **CAPÍTULO II**

### ***Ehrlichia canis* em cães no semiárido do Nordeste do Brasil: sorologia, detecção molecular e fatores associados**

Manuscrito submetido à Research in  
Veterinary Science.

***Ehrlichia canis* em cães no semiárido do Nordeste do Brasil: sorologia, detecção  
molecular e fatores associados**

Atticus Tanikawa<sup>a</sup>, Marcelo B. Labruna<sup>b</sup>, Andrea Costa<sup>b</sup>, Daniel M. Aguiar<sup>c</sup>, Andréia L.T. Melo<sup>c</sup>, Rodrigo S. Mendes<sup>a</sup>, Soraia V. Justiniano<sup>a</sup>, Clebert J. Alves<sup>a</sup>, Sérgio S. Azevedo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

<sup>b</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP

<sup>c</sup>Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil

## **Resumo**

A erliquiose canina é uma doença transmitida por carrapatos, causada principalmente pela *Ehrlichia canis*, com ocorrência mundial, cujo vetor principal é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência de infecção, soropositividade, e fatores de risco associados com a resposta de anticorpos e a positividade na PCR para *E.canis* em cães do semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Foram colhidas amostras de sangue de 108 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, na cidade de Patos, durante março a julho de 2011. Amostras de sangue foram utilizadas para a detecção de anticorpos contra *E. canis* utilizando a reação de imunofluorescência indireta, e para

---

\* **Autor para correspondência:** Sérgio Santos de Azevedo  
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Av. Universitária, s/nº, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil **e-mail:** sergio.azevedo@pq.cnpq.br

contagem das células hematológicas. Esfregaços sanguíneos foram confeccionados para detecção de mórulas típicas em leucócitos. A RT-PCR foi utilizada para análise molecular. Setenta e cinco (69.4%) dos 108 cães foram positivos para *E.canis*. Em seis cães (5.6%) foram observadas mórulas típicas de *E. canis* em monócitos. Leucopenia ( $P = 0.04$ ), linfopenia ( $P = 0.004$ ) e eosinopenia ( $P < 0.001$ ) foram as alterações hematológicas associadas com a positividade na PCR. Os seguintes fatores foram associados com a positividade na PCR: ambiente onde os cães permanecem (terra:  $P = 0.027$ ) e a frequência de limpeza do ambiente onde os cães permanecem (mensal:  $P < 0.001$ ). Houve uma tendência de aumento na soropositividade em animais mais velhos ( $P = 0.029$ ).

Palavras-chave: Erliquiose, soroprevalência, detecção molecular, cães, Nordeste do Brasil.

### **Abstract**

Canine ehrlichiosis is a tick-borne disease, caused mainly by *Ehrlichia canis*, with a worldwide occurrence, whose main vector is the *Rhipicephalus sanguineus* tick. The aim of this work was to determine the frequency of infection, seropositivity, and factors associated with antibody response and PCR positivity to *E. canis* in dogs from semiarid region of the Paraíba State, Northeastern Brazil. Blood samples were collected from a total of 108 dogs attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande in Patos city during March to July 2011. Blood samples were analyzed for antibodies to *E. canis* using an IFAT test, and hematological cell counts were calculated. Blood smears were prepared to detect typical morulae in leukocytes. A real-time PCR was used for molecular analysis. Seventy-five (69.4%) of the 108 dogs were found to be seropositive to *E. canis*, while four dogs (3.7%) were positive in real-time

PCR for *E. canis*. In six dogs (5.6%) typical morulae of *E. canis* were observed in monocytes. Leukopenia ( $P = 0.04$ ), lymphocytopenia ( $P = 0.004$ ) and eosinopenia ( $P < 0.001$ ) were the hematological alterations associated with PCR positivity. Animals that stay in environment composed solely of land ( $P = 0.027$ ) and those whose owners reported that the cleaning of the environment where animals stay was performed monthly ( $P < 0.001$ ) had a higher frequency of positivity in PCR. Increasing seropositivity was found in older dogs ( $P = 0.029$ ).

*Keywords:* *Ehrlichia canis*, seroprevalence, molecular detection, dogs, Northeastern Brazil

## 1. Introdução

A erliquiose canina é uma doença cosmopolita transmitida por carrapatos causada por bactérias intracelulares obrigatórias, Gram-negativas, com tropismo por células mononucleares do gênero *Ehrlichia* (Cohn, 2003; Stich et al., 2008).

Dentre as espécies de *Ehrlichia*, *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis* são responsáveis por causar a doença em cães e seres humanos (Dumler et al., 2001). *E. canis* é o agente etiológico primário da erliquiose monocítica canina (CME), uma doença cosmopolita de cães transmitida por carrapatos

Bactérias do gênero *Ehrlichia* são transmitidas para os cães pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Vieira et al., 2011), o que explica a alta prevalência da infecção em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, devido à distribuição geográfica dos vetores (Andereg et al., 1999). No Brasil, o principal vetor é o carrapato *R. sanguineus*, contudo estudos sugerem a possibilidade do *Amblyomma cajennense*

estar atuando como vetor em áreas rurais (Costa Jr et al., 2007; Dantas-Torres et al., 2010).

Até o momento, em seres humanos, existe duas doenças reconhecidas causadas por espécies de *Ehrlichia* sp: a erliquiose monocítica humana (HME) causada por *E. chaffeensis*; e a erliquiose granulocítica humana (HGE) causada por *E. ewingii* (Olano e Walker, 2002). No entanto, DNA de *Ehrlichia canis* foi detectado em pacientes com e sem sinais clínicos compatíveis com HME na Venezuela (Perez et al., 1996; Perez et al., 2006). No Brasil, embora existam relatos de confirmação sorológica de HME (Calic et al., 2004; Costa et al., 2005), as altas soroprevalências da doença em cães no Nordeste Brasileiro (35,6% a 72,5%) referidas em vários estudos (Labarhe et al., 2003; Carlos et al., 2007; Souza et al., 2010; Azevedo et al., 2011) levantam preocupações em relação ao potencial zoonótico da doença, pois a relação próxima existente entre os cães e seus proprietários pode favorecer o contágio aos seres humanos principalmente após a existência de relatos de infestação por carrapatos *R. sanguineus*.

Apesar de vários trabalhos terem sido conduzidos em cães no Nordeste do Brasil, em apenas dois (Carvalho et al., 2008; Souza et al., 2010) foi feita a confirmação molecular da infecção por *Ehrlichia* sp, ambos no Estado da Bahia. O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de *E. canis* em cães da região semiárida do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, utilizando sorologia e detecção molecular, bem como identificar fatores associados à infecção.

## **2. Materiais e Métodos**

O estudo foi realizado no município de Patos (7 ° 1'S, 37°19'W), Paraíba (Figura 1), de março a julho de 2011. O clima da região é semi-árido, quente e seco, com baixa pluviosidade. A temperatura máxima mensal varia de 28-33 °C e a temperatura média é

de 28,5°C. A umidade relativa é de 55% e a precipitação anual é de 700 mm (IBGE, 2012).

Amostras de sangue foram coletadas de 108 cães, com e sem suspeita clínica de erliquiose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, município de Patos. A amostra populacional selecionada foi obtida de cães encaminhados à clínica para avaliação geral de saúde, ou oriunda de cães doentes, após o consentimento dos proprietários.

Cerca de 4 mL de sangue foram coletados de cada cão por venopunção das veias cefálica ou jugular. Três mililitros de sangue foram armazenados em tubos sem anti-coagulante para posterior processamento em testes sorológicos e o restante foi armazenado em tubos de 1,5 ml estéreis contendo anti-coagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para análise molecular e hematológica. As amostras de sangue e soro foram armazenadas a -20°C.

Um questionário epidemiológico, que incluía perguntas relativas à possíveis fatores de risco associados à infecção por *E. canis*, foi aplicado a cada proprietário cujo cão foi selecionado para a coleta de sangue. As informações coletadas incluíram idade do animal, sexo, raça, área de atividade (casa, rua ou casa/rua) e alimentação, contato com açudes, presença de carrapatos, controle de carrapatos, ambiente onde os cães permanecem, frequência de limpeza do ambiente onde os cães permanecem, e contato com cães e gatos.

As pesquisas de hemoparasitas foram realizadas a partir de extensões do sangue periférico coradas com corante Panótico Rápido (Aguiar et al., 2007a). As contagens de hemácias, hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas foram realizadas de acordo com Jain (2000) e Kaneko (1997).

A pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia* nos soros foi realizada com a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A fim de obter o antígeno, *E.canis* (estirpe São Paulo) (Aguiar et al., 2008; Melo et al., 2011) foi cultivada em células caninas malignas (linhagem DH82), mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (Sigma Aldrich, EUA) com adição de 5 % de soro de vitelo (Hiclone, EUA), em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37 °C de acordo com Aguiar et al.,( 2008). A diluição de 1:40 em PBS com 0,5% de albumina de soro bovino foi empregado como ponto de corte. Um conjugado comercial de fluoresceína com anti-IgG canina (Sigma Aldrich, USA) foi utilizado como anticorpo secundário. As reações foram realizadas conforme Aguiar et al. (2007a). As lâminas foram observadas através de um microscópio de luz ultravioleta (Immuno-Cell, Belgium) com objetiva de 400x.

A extração do DNA a partir de amostras de sangue canino foi individualmente realizada utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo-se as recomendações do fabricante para o isolamento do DNA a partir do sangue. As amostras de sangue foram processadas pela PCR utilizando os *primers dsb-330* (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') e *dsb-728* (5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCT TAAAGT-3'), visando a amplificação de fragmento de 409 pares de base (pb) do gene *dsb* de *Ehrlichia* sp. (Doyle et al., 2005; Aguiar et al., 2007a). Cada reação de amplificação foi realizada com 0,4 µMol de cada primer, 1,25 U de Taq Polymerase (Platinum *Taq*DNA polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA) tampão PCR (50 mM KCl and 20 mM Tris-HCl), 3mM MgCl<sub>2</sub>, mistura de dNTP (0.2 mM cada) 5 µl de molde de DNA e água até um volume final de 50 µL. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos seguida de 50 ciclos de 15 seg a 95 °C, 30 seg a 58°C, e 30 seg a 72°C por 5 min. Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,6%, corados com brometo de etídio em transiluminação

ultravioleta. Controles positivo (DNA extraído de cultura celular de *E. canis*) e negativo (água) foram incluídos em todos os ensaios de PCR.

Uma PCR em tempo real (RT-PCR) do gene *dsb* foi realizada utilizando a sonda TaqMan (5'AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3') específica para *E. canis* (Doyle et al., 2005). O protocolo de ciclos térmicos consistiu de um ciclo de fusão único de 95 °C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto. A RT-PCR foi realizada em placas de 96 poços em um sistema de detecção multicolor iQ iCycler para RT-PCR equipado com conjuntos de filtros adequados e analisados com o software iQ versão 3,1 (BioRad Laboratories).

Duas análises de fatores de risco foram realizadas pelo teste qui-quadrado (Zar, 1999) considerando soropositividade e detecção molecular de *E. canis* como variáveis dependentes, e os dados obtidos nos questionários epidemiológicos como variáveis independentes, com nível de significância de 5%. Associações entre hemácias, hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas de cães positivos e negativos na PCR também foram verificadas pelo teste qui-quadrado. Os resultados da presença de mórulas e sorologia foram comparados com os resultados da PCR (padrão-ouro) por meio do cálculo da sensibilidade, especificidade e indicador Kappa (Thrusfield, 2007).

### **3. Resultados**

Do total de 108 cães utilizados no presente estudo, 75 (69,4%) foram soropositivos para anticorpos anti-*E.canis* com títulos iguais ou superiores a 40. No geral, três (4%), dois (2,7%), cinco (6,7%), um (1,3%), dois (2,7%), quatro (5,3%), 12 (16%), 14 (18,7%), 16 (21,3%), 10 (13,3%), três (4%) e três (4%) animais foram



soropositivos com títulos de 40, 80, 160, 320, 1.280, 2.560, 5.120, 10.240, 20.480, 40.960, 81.920 e 163.840, respectivamente.

Nos esfregaços sanguíneos obtidos de seis cães (5,6%) foram observadas mórulas típicas de *E. canis* em leucócitos. Quatro cães (3,7%) foram positivos na RT-PCR para *E. canis* (Figura 2). Comparando a RIFI com os resultados da PCR (Tabela 1) todas as amostras positivas na PCR ( $n = 4$ ) também foram positivas na RIFI, mas apenas 33 amostras foram negativas em ambos os testes, com uma concordância fraca, sensibilidade de 100% e especificidade de 32%. A comparação entre os resultados da presença de mórulas e PCR é mostrada na Tabela 2. Duas amostras positivas na PCR apresentaram mórulas, e 100 amostras foram negativas em ambos os testes, com concordância muito fraca, sensibilidade de 50% e especificidade de 96 %. Associações entre as variáveis hematológicas e os resultados positivos na PCR são demonstradas na Tabela 3. Ocorreu uma maior frequência de amostras positivas na PCR para as variáveis relacionadas à presença de mórulas ( $P = 0,015$ ), leucopenia ( $<5.500$  leucócitos) ( $P = 0,04$ ), linfopenia ( $<1.000$  linfócitos) ( $P = 0,004$ ) e eosinopenia ( $<100$  eosinófilos) ( $P < 0,001$ ).

As associações entre as variáveis obtidas nos questionários epidemiológicos e os resultados da PCR e sorologia estão demonstradas na Tabela 4. Os fatores associados à positividade na PCR foram: ambiente onde os cães permanecem ( $P = 0,027$ ); e frequência de limpeza do ambiente onde os cães permanecem ( $P < 0,001$ ). Na sorologia, houve uma tendência de aumento na soropositividade em animais mais velhos ( $P = 0,029$ ).

#### 4. Discussão

A frequência de anticorpos anti-*E. canis* é dependente da distribuição do vetor, *R. sanguineus*, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No presente trabalho, a frequência de anticorpos anti-*E. canis* encontrada foi de 69,4%, superior ao valor encontrado (36%) em estudo similar conduzido em Ilhéus e Itabuna, Estado da Bahia, Brasil (Carlos et al., 2007). Por outro lado, em estudo realizado na mesma área do presente trabalho, a frequência de anticorpos anti-*E. canis* foi de 72,5% (Azevedo et al., 2011). No Brasil, a soroprevalência da erliquiose canina difere entre os diversos Estados, variando de 0,7% a 92,3% (Oliveira et al., 2000; Labarthe et al., 2003; Trapp et al., 2006; Aguiar et al., 2007b; Carlos et al., 2007; Costa Jr. Et al., 2007; Nakaghi et al., 2008; Silva et al., 2010; Souza et al., 2010; Azevedo et al., 2011 ; Melo et al., 2011). Essa variação pode ser atribuída à diversidade de desenhos experimentais e testes de diagnósticos utilizados, bem como aos fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da doença (Rodríguez-Vivas et al., 2005; Souza et al., 2010).

O DNA de *E. canis* foi encontrado em quatro (3,7%) de 108 amostras de sangue. A infecção pela *E. canis*, confirmada na PCR em cães soropositivos, foi detectada em 5,3% (4/75) dos animais soropositivos no presente estudo. Ao comparar a ocorrência de anticorpos anti-*E. canis* com resultados da PCR ocorreu uma concordância fraca (Kappa = 0,033) entre os testes, e sensibilidade e especificidade de 100% e 32%, respectivamente, o que poderia explicar o alto percentual (69,4%) de cães soropositivos neste estudo. Em trabalho anterior realizado no Estado da Bahia (Souza et al., 2010) 34,5% (58/168) dos cães soropositivos pela *E. canis* foram confirmados pela nested-PCR. A diferença no número de cães soropositivos nos quais a infecção foi confirmada pela PCR tem duas explicações possíveis (Souza et al., 2010). Em primeiro lugar, considerando-se que os animais infectados normalmente não apresentam sinais

clínicos da doença, alguns dos animais soropositivos podem ter evoluído para uma cura espontânea enquanto os níveis de anticorpos anti-*E.canis* continuaram detectáveis (Harrus et al., 1998; Rodriguez-Vivas et al., 2005; Souza et al, 2010). Em segundo lugar, na fase aguda da infecção, *Ehrlichia* sp. pode ser facilmente detectada no sangue, enquanto que nas fases subclínica e crônica, os tecidos mais adequados para a detecção incluem o baço e a medula óssea, respectivamente (Harrus et al., 2004; Mylonakis et al., 2004), de modo que a capacidade de detecção do DNA de *E. canis* em cães soropositivos dependerá do tipo de amostra coletada. Como no presente estudo apenas amostras de sangue foram utilizadas para PCR, e cães com e sem suspeita clínica foram utilizados, é possível que os cães nas fases subclínica e crônica não foram diagnosticados corretamente.

O exame de esfregaço sanguíneo é empregado para confirmar a suspeita clínica de erliquiose canina pela observação de mórulas típicas de *E. canis* em monócitos, que são mais facilmente detectáveis durante a fase aguda da doença (Rodriguez-Vivas et al., 2005). A ocorrência de seis cães (5,6%) com mórulas corrobora os resultados de Ristic e Holanda (1993) e Rodriguez-Vivas et al. (2005), que relataram que 4% e 5% dos esfregaços sanguíneos continham mórulas de *E.canis*. Embora tenha sido observada uma associação entre a ocorrência de mórulas e os resultados positivos na PCR ( $P = 0,015$ ), ao comparar ambos os métodos houve uma concordância fraca ( $Kappa = 0,372$ ), e sensibilidade e especificidade de 50% e 96 %, respectivamente, sugerindo que o exame de esfregaço sanguíneo pode produzir uma alta porcentagem de resultados falso-negativos. Esse exame não é um método eficaz de diagnóstico, pois a visualização das mórulas ocorre mais comumente durante a fase aguda, e a porcentagem de células infectadas é geralmente inferior a 1% (Cadman et al, 1994; Mylonakis et al, 2003; Vieira et al, 2011).

As alterações hematológicas que apresentaram associação com a ocorrência de resultados positivos na PCR foram leucopenia ( $P = 0.04$ ), linfopenia ( $P = 0.004$ ) e eosinopenia ( $P < 0.001$ ), similar ao observado por Meneses et al. (2008). Cães leucopênicos podem estar relacionados a infecções provocadas pela *E. canis*, que causa quadros de supressão medular, enquanto que a eosinopenia e a linfopenia podem ser induzidas por mecanismos imunológicos que promovem uma vasculite generalizada em vários órgãos de cães infectados ocasionando sequestro de grande quantidade dessas células para os tecidos (Mendonça et al., 2005).

Foi observada uma tendência de aumento da frequência de animais soropositivos na RIFI com o aumento da idade ( $P = 0,029$ ), o que pode ser justificado pela maior exposição destes animais ao agente infeccioso em função da idade. Além disso, como os cães mais jovens são mantidos em regime domiciliar, devido à sua maior susceptibilidade a doenças, eles acabam sendo menos expostos ao carrapato vetor (Baneth et al., 1998; Azevedo et al., 2011).

Foi observado que animais cujo ambiente é composto unicamente por terra apresentaram maior frequência de positividade na PCR ( $P = 0,027$ ). Como os quintais geralmente são constituídos por este tipo de ambiente, o contato dos cães com carrapatos vetores acaba sendo favorecido, pois apresentam biótopos adequados para a manutenção do *R. sanguineus* (Cruz-Vasquez et al., 1999; Soares et al., 2006), principalmente quando associados a falhas no combate a ectoparasitas ou quando há alta densidade de hospedeiros (Dantas-Torres et al., 2010).

Em animais cujos proprietários relataram a realização de limpeza mensal do ambiente onde o animal permanece foi observada alta frequência de positividade na PCR ( $P < 0,001$ ). A falta de limpeza periódica também pode aumentar os riscos de infecção, pois limpezas realizadas a longos intervalos dificultam a visualização dos

carrapatos no ambiente, devido ao hábito do *R. sanguineus* de se esconder em restos de entulhos, frestas de paredes e buracos, tornando os cães mais susceptíveis, pois esta espécie de carrapato geralmente aparece nos períodos de hematofagia, quando sai em direção ao hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo possibilitando a transmissão da *E. canis* (Labruna e Pereira, 2001).

Embora não tenha havido associação entre o contato com gatos e a positividade na PCR ( $P = 0,142$ ), 10,5% dos cães que tiveram contato com gatos foram positivos na PCR, enquanto que apenas 2,2% dos cães que não tiveram contato com gatos foram positivos. Oliveira et al. (2009) identificaram DNA de *E. canis* pela nested-PCR em felinos no Brasil. Como estes animais podem ser infestados pelo *R. sanguineus* existe a possibilidade dos felinos estarem participando da epidemiologia da erliquiose no Brasil (Mendes-de-Almeida et al., 2010). Isto pode acontecer quando os cães entram em contato com gatos errantes permitindo a transmissão indireta da *E. canis* através da participação de um carrapato infectado obtido de um cão infectado. De fato, evidenciamos que, embora sem associação estatística, cães criados soltos apresentaram uma maior frequência de infecção (10%) em comparação com animais criados no domicílio ou em regime semidomiciliar (2,3% e 3,6%, respectivamente).

## 5. Referências

Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Pinter, A., Gennari, S.M., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B., 2007a. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. J. Med. Entomol. 44, 126-132.

- Aguiar, D.M., Saito, T.B., Hagiwara, M.K., Machado, R.Z., Labruna, M.B., 2007b. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. Cienc. Rural 37, 796-802.
- Aguiar, D.M., Hagiwara, M.K., Labruna, M.B. 2008. In vitro Isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. Braz. J. Microbiol. 39, 489-493.
- Andereg, P.I., Passos, L.M.F., 1999. Erliquiose canina: revisão. Rev. Clin. Vet. 4, 31-38.
- Azevedo, S.S., Aguiar, D.M., Aquino, S.F., Orlandelli, R.C., Fernandes, A.R.F., Uchoa, I.C.P., 2011. Seroprevalence and risk factors associated to *Ehrlichia canis* in dogs from the semiarid of Paraíba State, Northeastern Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 48, 14-18.
- Baneth, G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Pappalardo, B. Ryan, J., 1998. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. Vet. Parasitol. 74, 133-142.
- Cadman, H.F., Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Zhou, R., Mason, P.E., 1994. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay whit immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. Vet. Rec. 135, 362.
- Calic, S.B., Galvão, M.A.M., Bacellar, F., Rocha, C.M.B.N., Mafra, C.L., Leite, R.C., Walker, D.H., 2004. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. Braz. J. Infect. Dis. 8, 259-262.
- Carlos, R.S.A., Neta, E.S.M., Spagnoli, F.H., Oliveira, L.L.S., Brito, R.L.L., Albuquerque, G.R., Almosny, N.R., 2007. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na Microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 16, 117-120.

- Costa, P.S.G., Brigatte, M.E., Greco, D.B., 2005. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetti*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 853-859.
- Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Carlos, R.S.A., Albuquerque, G.R., 2008. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. Genet. Mol. Res. 7, 657-662.
- Cohn, L.A., 2003. Ehrlichiosis and related infections. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 33, 863-884.
- Costa Jr., L.M.C., Rembeck, K., Ribeiro, M.F.B., Beelitz, P., Pfister, K., Passos, L.M.F., 2007. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. Vet. J. 174, 673-676.
- Cruz-Vazquez, C., Garcia-Vazquez, Z., 1999. Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. Exp. Appl. Acarol. 23, 277-280.
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brow dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit. Vectors 8, 26.
- Doyle, C.K., Labruna, M.B., Breitschwerdt, E.B., Tang, Y.W., Corstvet, R.E., Hegarty, B.C., Bloch, K.C., Li, P., Walker, D.H., McBride, J.W., 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* Gene. J. Molec. Diagn. 7, 504-510.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with

- Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.
- Jain, N.C., 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. Williams and Wilkins, Philadelphia, 1344 pp.
- Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., Shaw, S., 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4488-4490.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.N., Bark, H., 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 73-76.
- Kaneko, J.J., 1997. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press, San Diego, pp. 117-138.
- Labarthe, N., Campos Pereira, M., Barbarini, O., McKee, W., Coimbra, C.A., Hoskins, J., 2003. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet. Ther.* 4, 67-75.
- Labruna, M.B., Pereira, M.C., 2001. Carrapatos em cães no Brasil. *Clin. Vet.* 30, 24-32.
- Melo, A.L.T., Martins, T.F., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Pacheco, R.C., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick-borne Dis.* 2, 213-218.
- Mendes-de-Almeida, F., Crissiuma, A.L., Gershony, L.C., Willi, L.M., Paiva, J.P., Guerrero, J., Labarthe, N., 2011. Characterization of ectoparasites in an urban cat



- (*Felis catus* Linnaeus, 1758) population of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol. Res.* 108, 1431-1435.
- Mendonça, C.S., Mundim, A.V., Costa, A.S., Moro, T.V., 2005. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Biosci. J.* 21, 167-174.
- Meneses, I.D.S., Souza, B.M.P.S., Teixeira, C.M.M., Guimarães, J.E., 2008. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 9, 770-776.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.W., Kontos, V.S., 2004. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40, 174–184.
- Nakaghi, A.C.H., Machado, R.Z., Costa, M.T., André, M.R., Baldani, C.D., 2008. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological, and molecular aspects. *Cienc. Rural.* 38, 766-770.
- Olano, J.P., Walker, D.H., 2002. Human ehrlichioses. *Med. Clin. North Am.* 86, 375-392.
- Oliveira, D., Tie Nishimori, C., Costa, M.T., Machado, R.Z., Castro, M.B., 2000. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 9, 1-5.
- Oliveira, L.S., Mourão, L.C., Oliveira, K.A., Agostini, M.M., Oliveira, A.C., Almeida, M.R., Fietto, J.L.R., Conceição, L.G., Filho, J.D.R., Galvão, M.A.M., Mafra, C., 2009. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 53-54.

- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., Rikihisa, Y., 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. NY Acad. Sci.* 1078, 110-117.
- Perez, M., Rikihisa, Y., Wen, B., 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2133-2139.
- Ristic, M., Holland, C.J., 1993. Canine ehrlichiosis. In: Woldechiwet, Z., Ristic, M. (Eds.), *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. Pergamon Press, Oxford, pp. 169-186.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Albornoz, R.E.F, Bolio, G.M.E., 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet. Parasitol.* 127, 75-79.
- Skotarczack, B., 2003. Canine ehrlichiosis. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10,137-141.
- Silva, J.N., Almeida, A.B.P.F., Sorte, E.C.B., Freitas, A.G., Santos, L.G.F., Aguiar, D.M., Sousa, V.R.F., 2010. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 108-111.
- Soares, A.O., Souza, A.D., Feliciano, E.A., Rodrigues, A.F.S.F., D'Agosto, M., Daemon, E., 2006. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15, 13-16.
- Souza, B.M.P.S., Leal, D.C., Barboza, D.C.P.M., Uzêda, R.S., De Alcântara, A.C., Ferreira, F., Labruna, M.B., Gondim, L.F.P., Franke, C.R., 2010. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 89-93.

- Stich, R.W., Schaefer, J.J., William, G.B., Needham, G.R., Jittapalapong, S., 2008. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 158, 256-273.
- Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., Amude, A.M., Morais, H.S., 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet. Parasitol.* 140, 223-230.
- Thursfield, M., 2007. *Veterinary Epidemiology*. Wiley Blackwell, Oxford, 610 pp.
- Vieira, R.F.C., Biondo, A.W., Guimarães, A.M.S., Santos, A.P., Santos, R.P., Dutra, L.H., Diniz, P.P.V.P., Morais, H.A., Messick, J.B., Labruna, M.B., Vidotto, O., 2011. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 1-12.
- Zar, J.H. (Ed.), 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, 663 pp.

### **Legenda das figuras**

Fig. 1. Localização espacial do Município de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Fig. 2. Eletroforese em gel de agarose do fragmento 409-pb do gene *dsb* de *Ehrlichia canis* em amostras de sangue de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Município de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Linhas 1 e 8, marcador molecular padrão; Linha 6, controle positivo (DNA de *E. canis* extraído de cultivo celular); Linha 7, controle negativo (água); Linhas 2-5, amostras de sangue positivas.

Tabela 1. Comparação entre sorologia e a PCR para os cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil

PCR	RIFI <sup>a</sup>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4	0	4
Negativo	71	33	104
Total	75	33	108

<sup>a</sup> Kappa = 0,033 (erro padrão = 0,017); Sensibilidade = 1,00 (IC 95% = 0,49-1,00); Especificidade = 0,32 (IC 95% = 0,23-0,42)

Tabela 2. Comparação entre a presença de mórulas com a PCR para os cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

PCR	Mórulas <sup>a</sup>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	2	4
Negativo	4	100	104
Total	6	102	108

<sup>a</sup> Kappa = 0,372 (erro padrão = 0,201); Sensibilidade = 0,50 (IC 95% = 0,07-0,93); Especificidade = 0,96 (IC 95% = 0,90-0,99)

Tabela 3. Associação entre achados dos exames hematológicos e resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR), em cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

Variável	No. total de cães	No. de cães positivos	P
<b>Mórulas</b>			
Presentes	6	2 (33,3)	0,015
Ausentes	102	2 (2,0)	
<b>Hemácias</b>			
>5.500	36	2 (5,6)	0,763
5.500-8.500	71	2 (2,8)	
<8.500	1	0 (0,0)	
<b>Hemoglobina</b>			
< 12%	35	2 (5,7)	0,738
12-18%	72	2 (2,8)	
< 18%	1	0 (0,0)	
<b>Leucócitos</b>			
< 5.500	12	2 (16,7)	0,040
5.500-16.900	61	1 (1,6)	
> 16.900	35	1 (2,9)	
<b>Neutrófilos</b>			
< 3.000	8	1 (12,5)	0,356
3.000-12000	78	2 (2,6)	
> 12.000	22	1 (4,5)	
<b>Linfócitos</b>			
< 1.000	9	2 (22,2)	0,004
1.000-4.900	88	1 (1,1)	
> 4.900	11	1 (9,1)	
<b>Monócitos</b>			
< 100	2	0 (0,0)	0,942
100-1.400	105	3 (3,8)	
> 1.400	1	0 (0,0)	
<b>Eosinófilos</b>			
< 100	4	2 (50,0)	< 0,001
100-1.490	88	2 (2,3)	
> 1.490	16	0 (0,0)	
<b>Plaquetas</b>			
< 175.000	16	1 (6,2)	0,479
≥ 175.000	92	3 (3,3)	

Tabela 4. Análise dos fatores de associados a infecção pela *Ehrlichia canis* pelo Teste Qui-Quadrado ( $X^2$ ) para os cães atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG, Campus Patos, Paraíba, Brasilandre

Variável	No. dogs tested	IFAT		PCR	
		No. positive dogs (%)	<i>P</i> -value	No. positive dogs (%)	<i>P</i> -value
<b>Sexo</b>					
Macho	75	54 (72.0)	0.256	2 (2.7)	0.584
Fêmea	33	21 (63.6)		2 (6.1)	
<b>Raça</b>					
Raça Mestiça	60	43 (71.7)	0.726	1 (1.7)	0.321
Raça Pura	48	32 (66.7)		3 (6.2)	
<b>Idade (anos)</b>					
0 – 1	25	12 (48.0)	0.029	1 (4.0)	0.476
1 – 3	28	21 (75.0)		2 (7.1)	
> 3	55	42 (76.4)		1 (1.8)	
<b>Presença de carrapatos</b>					
Sim	101	71 (70.3)	0.435	4 (4.0)	1.000
Não	7	4 (57.1)		0 (0.0)	
<b>Controle de Carrapatos</b>					
Sim	82	61 (74.4)	0.177	2 (2.4)	0.071
Semana	4	3 (75.0)		1 (25.0)	
Quinzenal/mensal	12	6 (50.0)		0 (0.0)	
Anual	10	5 (50.0)		1 (10.0)	
<b>Área de atividade do cão</b>					
Casa	43	35 (81.4)	0.074	1 (2.3)	0.511
Casa/Rua	55	33 (60.0)		2 (3.6)	
Rua	10	7 (70.0)		1 (10.0)	
<b>Alimentação</b>					
Comercial	27	18 (66.7)	0.725	1 (3.7)	0.217
Caseira	75	52 (69.3)		2 (2.7)	
Sobras	6	5 (83.3)		1 (16.7)	
<b>Contato com cães</b>					
Sim	63	44 (69.8)	1.000	3 (4.8)	0.639
Não	45	31 (68.9)		1 (2.2)	
<b>Contato com gatos</b>					
Sim	19	13 (68.4)	1.000	2 (10.5)	0.142
Não	89	62 (69.7)		2 (2.2)	



Ambiente onde os cães permanecem					
Cimento	69	51 (73.9)		1 (1.4)	
Terra/cimento	16	9 (56.3)		0 (0.0)	
Terra	23	15 (65.2)	0.340	3 (13.0)	0.027
Frequência de limpeza do ambiente onde os cães permanecem					
Não	71	50 (70.4)		2 (2.8)	
Diário/semanal	23	16 (69.6)		0 (0.0)	
Quinzenal	13	8 (61.5)		1 (7.7)	
Mensal	1	1 (100)	0.836	1 (100)	< 0.001
Contato com açudes					
Não	22	16 (72.7)		1 (4.5)	
Sim	86	59 (68.6)	0.908	3 (3.5)	1.000

---

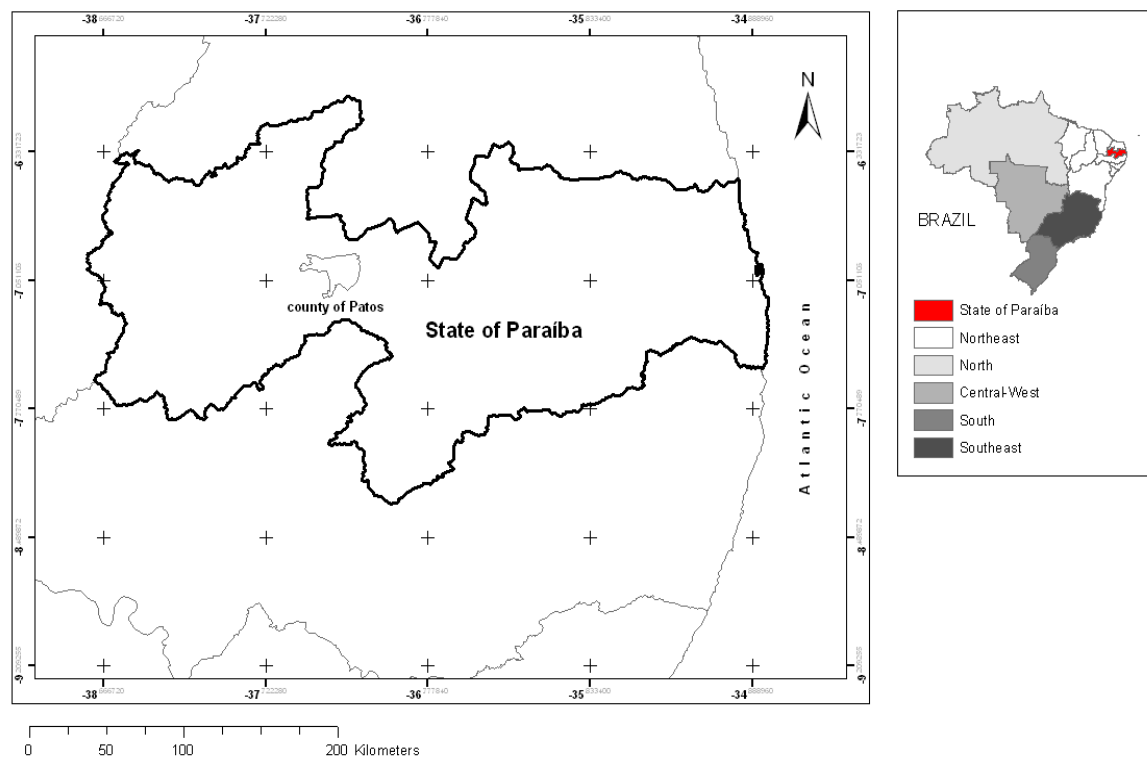


Figura 1: Localização espacial da Cidade de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil

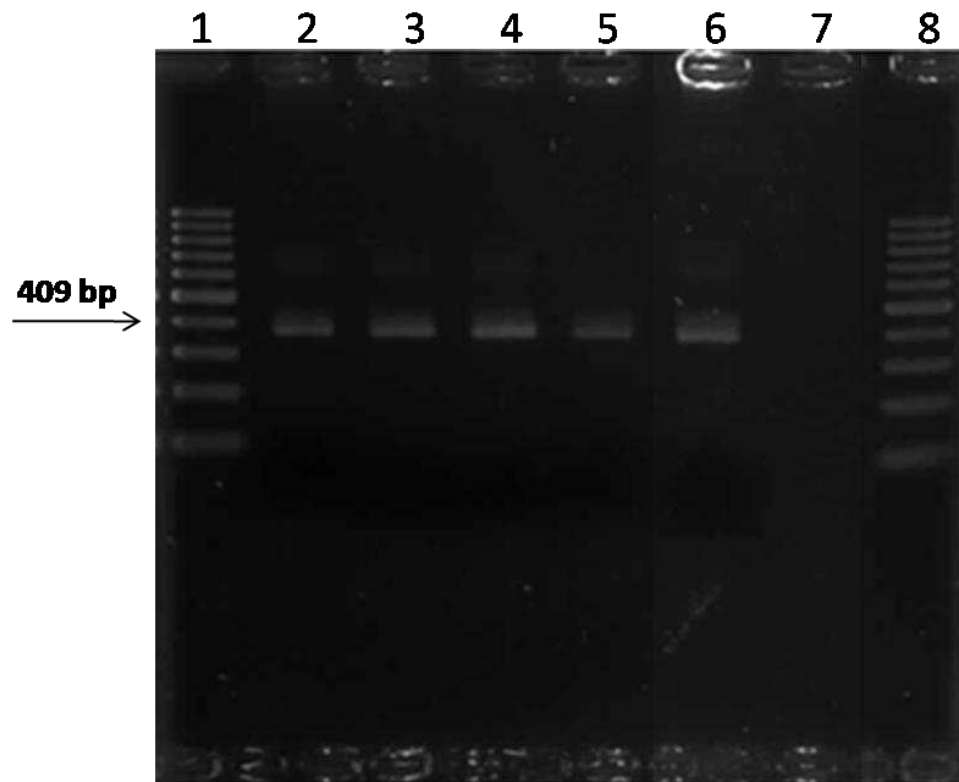


Figura 2 Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicons do gene *dsb* de *Ehrlichia spp* para as amostras de DNA para os cães amostrados durante o estudo no Hospital Veterinário

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos com o presente estudo confirmam a presença da *Rickettsia felis* infectando o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em cães do semiárido paraibano, sugerindo a possibilidade da circulação deste agente no Nordeste do Brasil e deste carrapato como vetor.

A ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães do semiárido paraibano foi confirmada por sorologia e detecção molecular, sugerindo que ambientes caninos compostos por terra e limpeza deste ambiente realizada com periodicidade mensal podem ser fatores de risco para a ocorrência da infecção.

## ANEXOS

**CAPÍTULO I:** Manuscrito submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária/  
UNESP – Jaboticabal.

Link: <http://cbpv.org.br/rbpv/>

**CAPÍTULO II :** Manuscrito submetido à Research in Veterinary Science.

Link: <http://www.elsevier.com/journals/research-in-veterinary-science/0034-5288/guide-for-authors>